

7. СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНЕ КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ У ВАРІАНТІ МЕТОДУ ПОКАЗНИКА ПОГЛИНАННЯ

Кількісне визначення лікарських засобів (ЛЗ) методом спектрофотометрії (СФ) у варіанті методу показника поглинання (МПП) — фармакопейний метод аналізу. Головна перевага МПП — це прямий метод аналізу (такий як, наприклад, титрування), який не вимагає використання стандартних зразків.

У цьому розділі розглядається стандартизована процедура проведення валідації спектрофотометричних методик кількісного визначення у варіанті МПП. Отримані висновки застосовні, передусім, до синтетичних субстанцій і ЛЗ на їх основі. Валідація сумарних препаратів (зокрема, рослинної сировини) потребує окремого розгляду, оскільки деякі валідаційні характеристики (правильність, специфічність) для них є невизначеними.

7.1. Загальне рівняння для повної невизначеності методики аналізу

Загальне рівняння для повної відносної невизначеності методики аналізу (Δ_{As} , %) у випадку методу показника поглинання (МПП) має вигляд:

$$\begin{aligned}\Delta_{As}^2 &= [\delta_{noise}^2 + \Delta_{FAO}^2 + \Delta_{SP}^2] + \delta_{cal}^2 = \\ &= \Delta_{sample}^2 + \delta_{cal}^2 \leq \max \Delta_{As}^2.\end{aligned}\quad (7.1)$$

Тут Δ_{Sample} (вираз у квадратних дужках) — невизначеність, пов'язана безпосередньо з самим випробовуваним зразком;

δ_{noise} — невизначеність, яка вноситься домішками і допоміжними речовинами (плацебо); має систематичний (хоча і невідомий) характер для кожного конкретного аналізу і характеризує специфічність методики; може бути зменшена оптимізацією пробопідготовки (наприклад, екстракцією); зазначимо, що для різних серій випробовуваного зразка вона має систематичний характер;

Δ_{FAO} — невизначеність кінцевої аналітичної операції, тобто безпосередньо вимірювання оптичної густини; залежить від класу спектрофотометра; має випадковий характер і може бути зменшена збільшенням кількості повторів;

Δ_{SP} — невизначеність пробопідготовки; має дві складові, які пов'язані з розбавленням (тобто з невизначеностями зважування й об'єму мірного посуду) й обробкою зразка (екстракція, хімічні реакції тощо); має випадковий характер і може бути зменшена збільшенням кількості повторів і акуратністю їх проведення;

δ_{cal} — невизначеність градуювання, яка пов'язана з відмінністю оптичної густини на різних спектрофотометрах і з відхиленням від прямої пропорційності залежності оптичної густини від концентрації; має систематичний характер для кожного спектрофотометра і не може бути

зменшена збільшенням кількості повторів, акуратністю їх проведення й оптимізацією пробопідготовки;

$\max \Delta_{As}$ — максимально допустима повна невизначеність методики аналізу.

Як впливає зі співвідношень (4.8-4.9), максимально допустима невизначеність аналітичної методики ($\max \Delta_{As}$) пов'язана із симетричними допусками вмісту за специфікацією (B) співвідношеннями:

субстанції:
$$\Delta_{As} (\%) \leq \max \Delta_{As} = B. \quad (7.2)$$

ГЛЗ:
$$\Delta_{As} (\%) \leq \max \Delta_{As} = 0.32 \times B. \quad (7.3)$$

7.2. Нормалізовані координати

Вимоги до валідаційних характеристик простіше отримувати в нормалізованих координатах, оскільки в цьому разі вони залежать не від специфіки конкретного об'єкта, а тільки від допусків вмісту і діапазону (див. розділ 4.1).

У разі МПП визначення нормалізованих координат повністю співпадає з їх визначенням (6.2) для методу калібрувального графіка (МКГ).

$$\begin{aligned} X_i (\%) &= 100 \times C_i / C_{st}. & C_{st} &= C_{nom}. \\ Y_i (\%) &= 100 \times A_i / A_{st}. & A_{st} &= A_{nom}. \\ Z_i (\%) &= 100 \times Y_i / X_i. \end{aligned} \quad (7.4)$$

Тут C_{nom} — концентрація аналізованої речовини (г/100 мл), яка відповідає номінальній концентрації випробовуваного розчину за специфікацією. C_{nom} розраховується з номінальної наважки аналізованого зразка (m_{nom} , г), номінального вмісту у випробовуваному зразку аналізованої речовини ($Cont_{nom}$, %), втрати маси при висушуванні або вмісту води у %/відсотках (LOD) і розбавлення Dil .

$$\begin{aligned} C_{nom} &= [m_{nom} \times (100 - LOD)] \times Dil \times (Cont_{nom} / 100). \\ A_{nom} &= A_{1cm}^{1\%} \times C_{nom}. \end{aligned} \quad (7.5)$$

Для субстанцій $Cont_{nom} = 100$ %.

7.3. Специфічність

Виникає питання: чи завжди треба вимагати специфічності спектрофотометричного кількісного визначення у варіанті МПП?

Відповідно до загального співвідношення (7.1), перевірка специфічності у випадку СФ кількісного визначення зводиться до доведення незначущості (статистичної або практичної) невизначеності, спричиненої фоновим поглинанням (δ_{noise} , %) за аналітичної довжини хвилі (див. розділ 4), порівнюючи з максимально допустимою невизначеністю методики

аналізу $\max \Delta_{As}$. Це означає незначущість суми інформаційних коефіцієнтів (r) усіх домішок (включаючи продукти деградації δ_{imp} і допоміжні речовини δ_{exc}) за їх максимально допустимих за специфікацією концентрацій порівнюючи з максимально допустимою за специфікацією невизначеністю $\max \Delta_{As}$, тобто (див. (4.24)):

$$\delta_{noise} (\%) = \delta_{exc} + \delta_{imp} = 100 \times \sum_{i=1}^k r_{imp,i} \approx$$

$$\text{ГЛЗ:} \quad 100 \times \frac{\sum_{i=1}^k A_{Imp,i}}{A_{nom}} \leq 0.32 \times \max \Delta_{As}. \quad (7.6)$$

Тут A_{nom} — розрахована номінальна величина оптичної густини.

У разі ГЛЗ співвідношення (7.4) не викликає сумнівів. Кількісний (а за зовнішнього контролю часто і якісний) склад ГЛЗ апіорно невідомий. Вміст діючої речовини, на відміну від субстанцій, не може бути розрахований на підставі суми домішок. Завданням кількісного визначення ГЛЗ, на відміну від субстанцій, дійсно є знаходження вмісту діючої речовини. Тому методика кількісного визначення ГЛЗ має бути специфічною. Умови спектрофотометричного кількісного визначення ГЛЗ мають добиратися так, щоб виконувалося співвідношення (7.6).

Для субстанцій ситуація суттєво відрізняється. Завданням кількісного визначення для них не є знаходження концентрації діючої речовини (це може бути виконано значно простіше шляхом віднімання із 100 % суми домішок і води). Завданням кількісного визначення в разі субстанцій є доведення того, що знайдений вміст, у межах допустимої статистичної невизначеності, значуще не відрізняється від 100 %. Тобто фактично це ще одне випробування на ідентифікацію. Тому, за наявності жорсткого контролю (зазвичай хроматографічного) домішок, для кількісного визначення субстанцій можуть застосовуватися (і широко застосовуються) неселективні методи. Зокрема, для кількісного визначення субстанцій у фармакопях традиційно широко застосовується неспецифічний метод титрування. Застосування СФ у варіанті МПП для контролю якості субстанцій, з такого погляду, нічим не відрізняється від титрування.

Тому доведення специфічності спектрофотометричного кількісного визначення субстанцій у варіанті МПП на стадії проведення валідації, загалом, не потрібно.

7.4. Діапазон

Під час валідації методик кількісного визначення Фармакопея вимагає дослідження лінійності в діапазоні концентрацій не вужче 80-120 % від номінального значення. Цей діапазон може розширитися до 55-135 %

залежно від поставленого аналітичного завдання (випробування на розчинення, однорідність вмісту) (див. розділ 4). У разі аналізу лікарської рослинної сировини діапазон може бути ще ширше. Стандартне число точок — 9, розподілених рівномірно по діапазону. Величини нормалізованих концентрацій, SD_{range} і відповідні критерії для різних діапазонів і завдань описані в розділі 4.

Слід зазначити, що якщо методика призначається для кількісного визначення тільки субстанцій (для них допуски вмісту, як правило, не перевищують 97-103 %), то для дослідження лінійності цілком достатньо діапазону 90-110 %. Ураховуючи, що чим вужче діапазон досліджень, тим легше добитися необхідної лінійності, звуження діапазону досліджень для аналізу субстанцій може бути в деяких випадках критичним.

7.5. Невизначеність кінцевої аналітичної операції

Під час проведення спектрофотометричного аналізу рекомендується виконувати три паралельних вимірювання оптичної густини з вийманням кювет. Для такої процедури в разі прогнозу невизначеності кінцевої аналітичної операції у МПП рекомендується використовувати значення $\Delta_{FAO} = 0.49\%$ — див. співвідношення (4.27). Воно ґрунтується на відносному стандартному відхиленні повторних вимірювань оптичної густини з вийманням кювет $RSD_A = 0.52\%$, яке отримане під час проведення великого міжлабораторного експерименту. Фактична величина RSD_A на сучасних спектрофотометрах, а також рекомендації для кваліфікації спектрофотометрів ($\leq 0.25\%$) щонайменше вдвічі менше. Зазначимо, що величина $\Delta_{FAO} = 0.49\%$ є незначущою порівнюючи не тільки з максимально допустимою повною невизначеністю методики аналізу $\max \Delta_{As}$ для всіх ЛЗ, для кількісного визначення яких застосовується спектрофотометрія, але й порівнюючи з невизначеністю градування.

Отже, невизначеність вимірювання оптичної густини Δ_{FAO} на сучасних спектрофотометрах не відіграє суттєвої ролі в однокомпонентному спектрофотометричному аналізі у варіанті МПП, що зближує його з титруванням.

7.6. Невизначеність пробопідготовки

Невизначеність пробопідготовки (Δ_{SP}), загалом, має дві складові — невизначеність Δ_{Dil} , що пов'язана з розбавленням наважки (яка має в собі невизначеності зважування, піпеток і мірних колб), і невизначеність Δ_{Handle} , яка пов'язана з обробкою зразка (екстракція, випаровування, хімічні реакції тощо), тобто:

$$\Delta_{SP}^2 = \Delta_{Dil}^2 + \Delta_{Handle}^2 \quad (7.7)$$

Невизначеність розбавлення Δ_{Dil} може бути прогнозована на підставі вимог до мірного посуду (див. Табл. 4.2). Результати таких розрахунків величин Δ_{Dil} наведені в Табл. 8.1.

Прогнозувати ж невизначеність обробки зразка Δ_{handle} в загальному випадку неможливо. Під час аналізу синтетичних ЛЗ і відсутності ефектів взаємодії (кисотно-лужні, кольорові реакції тощо), повна невизначеність пробопідготовки співпадає з невизначеністю розбавлення, тобто $\Delta_{SP} = \Delta_{Dil}$. Оскільки невизначеність розбавлення може бути зменшена за рахунок оптимізації мірного посуду і процедури аналізу, то логічно вимагати, щоб у разі аналізу МПП синтетичних ЛЗ за власним поглинанням невизначеність пробопідготовки була незначущою порівнюючи з повною невизначеністю методики аналізу, тобто:

$$\text{синтетичні ЛЗ,} \quad \Delta_{SP} \approx \Delta_{Dil} \leq 0.32 \times \max \Delta_{As}. \quad (7.8)$$

власне поглинання

Слід зазначити, що фактична невизначеність розбавлення на практиці часто буває значно вище — за рахунок суб'єктивного фактора (недостатньої кваліфікації персоналу).

7.7. Невизначеність градуювання

Зі співвідношення (7.1) видно, що систематична похибка має дві складові — невизначеність δ_{noise} , яка спричинена фоновим поглинанням, і невизначеність градуювання δ_{cal} . Невизначеність δ_{noise} може бути оцінена під час перевірки специфічності (див. співвідношення (7.6)). З невизначеністю градуювання δ_{cal} ситуація значно складніша.

Валідація методик у варіанті МПП багато в чому подібна до валідації методик у варіанті методу калібрувального графіка (МКГ), яка була розглянута в розділі 6. Як і в МКГ, невизначеність градуювання δ_{cal} в МПП має дві основні складові:

$$\delta_{cal}^2 = \delta_A^2 + \delta_{line}^2. \quad (7.9)$$

Тут δ_A — невизначеність, спричинена невідтворюваністю показника поглинання (або, що те саме, невідтворюваністю оптичної густини A того самого розчину) на різних спектрофотометрах; δ_{line} — невизначеність, спричинена відхиленням калібрувального графіка від прямо пропорційної залежності (тобто тим, що вільний член прямої не дорівнює нулю). Внесок цих величин у загальну величину δ_{cal} суттєво різняться.

7.7.1. Невизначеність, спричинена відхиленням калібрувальної прямої від прямої пропорційності (δ_{line})

Загальне рівняння прямої у нормалізованих координатах має вигляд (див. розділ 4.3):

$$Y = b \times X + a. \quad (7.10)$$

Застосування методу стандарту і МПП ґрунтується на припущенні незначущості (статистичної або практичної) вільного члена a (див. розділ 4).

Показник поглинання (це питомий показник поглинання або будь-яка пропорційна йому величина) конкретної методики, який вноситься до специфікації, має визначатися для номінальної концентрації. У нормалізованих координатах номінальні значення дорівнюють $X_{nom} = Y_{nom} = 100\%$. Відповідно, показник поглинання (AC) у нормалізованих координатах для номінальної концентрації дорівнює $AC_{nom} = (100 \times b + a) / 100 = b + (a / 100)$. Для нижчого значення (X_L) діапазону концентрацій $AC_L = b + (a / X_L)$. Відносне змінення (у %) показника поглинання (δ_{line}) має бути незначущим порівнюючи з максимально допустимою невизначеністю методики аналізу $\max \Delta_{As}$ (див. розділ 4):

$$\begin{aligned} \delta_{line} &= \left| \frac{AC_{nom} - AC_L}{AC_{nom}} \right| \times 100 = \left| \frac{a \cdot [(1/X_L) - (1/100)]}{b + (a/100)} \right| \times 100 = \\ &= \left| \frac{a \cdot (100 - X_L)}{X_L} \right| \leq 0.32 \times \max \Delta_{As}. \end{aligned} \quad (7.11)$$

Звідси отримаємо вимоги до вільного члена лінійної залежності (7.10):

$$|a_{line}| \leq \frac{0.32 \times \max \Delta_{As} \times X_L}{100 - X_L}. \quad (7.12)$$

Ці вимоги до вільного члена в МПП дещо жорсткіші, ніж відповідні вимоги для методу стандарту (див. розділ 4). Використовуючи співвідношення (7.2-7.3) і задаючи нижню межу діапазону концентрацій X_L , можна отримати вимоги до a_{line} для різних допусків вмісту і діапазонів субстанцій і ГЛЗ. Результати таких розрахунків наведені в Табл. 7.2.

Однак слід зазначити, що вимоги (7.11-7.12) стосуються тільки етапу розробки методики у варіанті МПП, коли відсутня невизначеність показника поглинання, спричинена переходом на інший спектрофотометр. Під час проведення валідації методики МПП на іншому спектрофотометрі (а саме цей випадок ми і розглядаємо) співвідношення (7.11, 7.12) у чистому вигляді не застосовні, оскільки на систематичну похибку δ_{line} накладається систематична похибка δ_A (див. нижче) і відділити її неможливо.

7.7.2. Невизначеність показника поглинання (δ_A)

Величина δ_A має систематичний характер для цього спектрофотометра, але має випадковий характер для різних спектрофотометрів. Вона не може бути зменшена ретельністю експерименту. Можна припустити, що ця величина

однакова для різних довжин хвиль, але, зважаючи на вимоги ДФУ, вона сильно залежить від величини оптичної густини.

Відповідно до вимог загальної статті Фармакопеї «Абсорбційна спектрофотометрія в ультрафіолетовій і видимій областях», оптична густина розчину калію дихромату з точною концентрацією 0.060 мг/мл на різних спектрофотометрах має відрізнятись від номінальної (A_o) не більш ніж на $\Delta A_o = \pm 0.01$ од. оптичної густини незалежно від самого значення A_o . Це дає можливість розрахувати максимально допустиму відносну невизначеність оптичної густини (або, що те саме, питомого показника поглинання) розчину калію дихромату тієї самої концентрації на будь-якому спектрофотометрі. Результати таких розрахунків наведені в Табл. 7.1.

Невизначеність показника поглинання δ_A (%) — це максимально допустима статистично незначуща (з погляду Фармакопеї) відносна різниця між оптичними густинами розчину калію дихромату тієї самої концентрації на різних спектрофотометрах.

Статистично незначуща відносна різниця двох оптичних густин розчину тієї самої концентрації на різних спектрофотометрах, яку можна вважати невизначеністю показника поглинання ($\max \delta_A$), у $\sqrt{2}$ раз більше допустимого відхилення оптичної густини (ΔA) від номінального значення A_{nom} , тобто:

$$\max \delta_A = \sqrt{2} \times \frac{100 \times \Delta A}{A_{nom}}; \quad \Delta A = 0.01. \quad (7.13)$$

Розрахунки величини $\max \delta_A$ для різних номінальних оптичних густин A_{nom} наведені в Табл. 7.1.

Таблиця 7.1

Допустимі за Фармакопеєю* межі відхилень питомого показника поглинання калію дихромату від номінального значення на різних спектрофотометрах за різних довжин хвиль (λ); A_{nom} — номінальна оптична густина фармакопейного розчину (60 мг/мл) калію дихромату; $\max \delta_A$ — максимально допустима відносна невизначеність показника поглинання

λ , нм	ном $A_{1\text{см}}^{1\%}$	A_{nom}	ΔA	$100 \times \Delta A / A_{nom}$	$\max \delta_A$, %
Вимоги Фармакопеї					
235	124.5	0.75	0.01	1.34	1.9
257	144.5	0.87	0.01	1.15	1.6
313	48.6	0.29	0.01	3.43	4.8
350	107.3	0.64	0.01	1.55	2.2
430	15.9	0.95	0.01	1.05	1.5
Розрахункові величини					
		0.15	0.01	6.67	9.4
		0.20	0.01	5.00	7.1

		0.30	0.01	3.33	4.7
		0.40	0.01	2.50	3.5
		0.50	0.01	2.00	2.8
		0.60	0.01	1.67	2.4
		0.70	0.01	1.43	2.0
		0.80	0.01	1.25	1.8
		0.90	0.01	1.11	1.6
		1.00	0.01	1.00	1.4

* 2.2.25. Абсорбційна спектрофотометрія в ультрафіолетовій і видимій областях.

Як видно, максимально допустима за Фармакопеею відносна різниця показників поглинання на різних спектрофотометрах $\max \delta_A$ залежить від оптичної густини. Оптимальними значеннями оптичної густини для МПП можна вважати величини $A_{nom} = 0.5 - 1.0$, тобто:

МПП: $Optimum A_{nom} = 0.5 - 1.0.$ (7.14)

З Табл. 7.1 видно, що для цих значень A_{nom} похибка градування знаходиться в інтервалі від 1.4 до 2.8 %, що відповідає максимальним допускам вмісту для субстанцій 97-103 % і для ГЛЗ 90-110 %. Це також узгоджується з результатами професійного тестування, які показали, що застосування МПП метрологічно коректне для кількісного визначення лише ГЛЗ із допусками вмісту ± 10 % і ширше (тобто для $\max \Delta_{As} \geq 3.2$ %).

Слід зазначити, що подальше підвищення A_{nom} не має сенсу, оскільки діапазон $A_{nom} > 1.0$ не охоплюється вимогами Фармакопеї (див. Табл. 7.1).

Головним висновком Табл. 7.1 є те, що невизначеність показника поглинання δ_A , а з нею і повна систематична похибка методики δ_{tot} , не може бути зроблена незначущою порівнюючи із загальною невизначеністю методики аналізу $\max \Delta_{As}$ і тому необхідно, як і в разі методу калібрувального графіка (див. розділ 6), робити якісь припущення про її співвідношення з $\max \Delta_{As}$.

7.8. Правильність і прецизійність МПП

Повну невизначеність методики аналізу Δ_{As} можна представити як суму двох доданків — повних систематичної δ_{tot} і випадкової Δ_{prec} складових, тобто:

$$\Delta_{As}^2 = \delta_{tot}^2 + \Delta_{prec}^2 \leq \max \Delta_{As}^2. \quad (7.15)$$

Повна систематична похибка δ_{tot} характеризує правильність методики. Вона включає в себе декілька складових (див. вище). Це невизначеність показника поглинання δ_A , відхилення від лінійності δ_{line} і вплив домішок δ_{imp} . Слід зазначити, що хоча специфічність для аналізу субстанцій за допомогою МПП не потрібна (див. вище), однак наявність домішок може призводити до

значущого відхилення отриманих значень вмісту від 100 %. Якщо показники поглинання домішок вищі, ніж в основної речовини, то вони систематично завищують результати порівнюючи зі 100 %, а якщо нижчі, то занижують.

Розділити ці внески неможливо, але оцінити на стадії валідації їх сумарний внесок необхідно.

Випадкова складова Δ_{prec} характеризує прецизійність методики і включає в себе не тільки кінцеву аналітичну операцію, але й пробопідготовку.

Можна, як і в методі калібрувального графіка (МКГ) (див. розділ 6), припустити, що максимально допустимі внески систематичної δ_{tot} і випадкової Δ_{prec} складових повної невизначеності методики аналізу $\max \Delta_{As}$ приблизно однакові, тобто:

$$\delta_{tot} \leq \max \delta_{tot} = \max \Delta_{prec} \geq \Delta_{prec}. \quad (7.16)$$

У цьому разі, як показано для МКГ, з (7.15) випливає (див. розділ 6):

$$\max \delta_{tot} = \max \Delta_{prec} = (\sqrt{2} / 2) \times \max \Delta_{As} = 0.71 \times \max \Delta_{As}. \quad (7.17)$$

Ураховуючи співвідношення (7.2-7.3), отримаємо:

субстанції: $\max \delta_{tot} = \max \Delta_{prec} = 0.71 \times B. \quad (7.18)$

ГЛЗ: $\max \delta_{tot} = \max \Delta_{prec} = 0.23 \times B. \quad (7.19)$

Оскільки повна систематична похибка δ_{tot} включає в себе і невизначеність показника поглинання δ_A , із співвідношень (7.13) і (7.17) можна отримати вимоги до мінімального значення номінальної оптичної густини:

$$A_{nom} \geq \frac{2}{\max \Delta_{As}}. \quad (7.20)$$

Мінімальні значення A_{nom} , розраховані за співвідношенням (7.20), наведені в Табл. 7.2.

Ураховуючи рекомендації до оптимальної величини оптичної густини (7.14), з Табл. 7.1-7.2 видно, що величина $\max \Delta_{As}$ має бути не менше 2.5 %, а краще 3.0 %. У цьому разі виконується співвідношення (7.18).

Результати розрахунків $\max \delta_{tot}$ за співвідношеннями (7.16-7.20) наведені в Табл. 7.2.

Таблиця 7.2

Критичні значення систематичної ($\max \delta_{tot}$) і повної невизначеності ($\max \Delta_{As}$) методики аналізу і параметрів лінійної залежності $Y_i = b \times X_i + a$ для різних випробувань, $g = 9$ точок і різних допусків вмісту B

Випр обува ння*	Діапазон D , крок, RSD_{range} , %	B , %	$\max \Delta_{As}$, %	$\max \delta_{tot} =$ $\max \Delta_{prec}$, %	RSD_o , %	$\min R_c^2$	$\max a$, %	$\min A_{nom}$
Субстанції								
КВ	$D = 80 - 120$, крок = 5 $RSD_{range} =$ 13.69	1.0	1.0	0.7	0.37	0.9993	1.6	2.00
		1.5	1.5	1.1	0.56	0.9983	2.2	1.33
		2.0	2.0	1.4	0.75	0.9970	2.9	1.00
		2.5	2.5	1.8	0.93	0.9954	3.7	0.80
		3.0	3.0	2.1	1.1	0.9933	4.4	0.67
Готові лікарські засоби								
КВ	$D = 80 - 120$, крок = 5 $RSD_{range} =$ 13.69	5.0	1.6	1.1	0.60	0.9981	2.3	1.25
		7.5	2.4	1.7	0.90	0.9957	3.5	0.83
		10.0	3.2	2.3	1.2	0.9924	4.7	0.63
		15.0	4.8	3.4	1.8	0.9829	7.0	0.42
КВ,	$D = 50 - 150$, шаг = 12.5 $RSD_{range} =$ 34.23	20.	6.4	4.5	2.4	0.9952	5.0	0.31
ОВ	$D = 70 - 130$, шаг = 7.5 $RSD_{range} =$ 20.54		3.0	2.1	1.1	0.9934	3.1	0.67
Р	$D = 50 - 130$, крок = 10 $RSD_{range} =$ 30.43		3.0	2.1	1.1	0.9934	2.3	0.67
	$D = 55 - 135$, крок = 10 $RSD_{range} =$ 27.39		3.0	2.1	1.1	0.9934	2.4	0.67
КВ + ОВ + Р	$D = 55 - 135$, крок = 10 $RSD_{range} =$ 27.39	5.0	1.6	1.1	0.60	0.9981	1.3	1.25
		7.5	2.4	1.7	0.90	0.9957	1.9	0.83
		10.0	3.2	2.3	1.2	0.9924	2.6	0.63
		15.0	4.8	3.4	1.8	0.9829	3.9	0.42
		20.0	6.4	4.5	2.4	0.9696	5.2	0.31
КВ + ОВ + Р	$D = 60 - 135$, крок = 9.4 $RSD_{range} =$ 25.67	5.0	1.6	1.1	0.60	0.9981	1.4	1.25
		7.5	2.4	1.7	0.90	0.9957	2.1	0.83
		10.0	3.2	2.3	1.2	0.9924	2.7	0.63
		15.0	4.8	3.4	1.8	0.9829	4.1	0.42

		20.0	6.4	4.5	2.4	0.9696	5.5	0.31
--	--	------	-----	-----	-----	--------	-----	------

* КВ — кількісне визначення, ОВ — однорідність вмісту, Р — розчинення.

7.9. Критерії лінійності

Дослідження лінійності доцільно проводити, як зазвичай, на $g = 9$ точках (див. розділ 4).

7.9.1. Залишкове стандартне відхилення SD_o

Довірчий інтервал розкиду точок навколо прямої $Y_i = b \times X_i + a$ дорівнює $t(95\%, g - 2) \times SD_o$ і являє собою довірчий інтервал невизначеності аналізу власне зразка Δ_{prec} , який має задовольняти нерівності (7.16-7.20). Ураховуючи це, отримаємо:

$$\text{субстанції:} \quad \Delta_{prec} = t(95\%, g - 2) \times SD_o = 1.89 \times SD_o \leq 0.71 \times B. \quad (7.21)$$

$$\text{ГЛЗ:} \quad \Delta_{prec} = 1.89 \times SD_o \leq 0.23 \times B. \quad (7.22)$$

Звідси отримаємо вимоги до величини SD_o ($g = 9$):

$$\text{субстанції:} \quad SD_o \leq 0.37 \times B. \quad (7.23)$$

$$\text{ГЛЗ:} \quad SD_o \leq 0.12 \times B. \quad (7.24)$$

У разі випробувань «Однорідність вмісту» і «Розчинення» максимальна невизначеність методики аналізу $\max \Delta_{As} = 3.0\%$, що відповідає формальним допускам вмісту $B = 9.3\%$ (див. розділ 4). Цю величину і слід підставляти для цих випробувань у співвідношеннях (7.23-7.24).

7.9.2. Коефіцієнт кореляції

Коефіцієнт кореляції розраховують за формулою:

$$R_c = \sqrt{1 - \frac{RSD_o^2}{RSD_{range}^2}}. \quad (7.25)$$

Використання нормалізованих координат, співвідношень (7.23-7.24) і значень SD_{range} (стандартне відхилення концентрацій усіх модельних розчинів у нормалізованих координатах (див. розділ 4.3) дозволяє отримати критерії прийнятності для R_c . Ураховуючи високі значення R_c , доцільно замість них регламентувати величини R_c^2 . Такі розрахунки наведені в Табл. 7.2.

7.9.3. Вільний член лінійної залежності

Вільний член (a) прямої (7.10) характеризує систематичну похибку. Відповідно до розділу 4.4.3.3, вимоги до нього можуть бути двох типів.

1. *Статистично* незначуща відмінність від нуля: величина a має бути менше довірчого інтервалу своєї невизначеності, тобто ($g = 9$):

$$\text{статистична незначущість: } a \leq t(95\%, g - 2) \cdot s_a = 1.89 \cdot s_a. \quad (7.26)$$

Тут s_a — стандартне відхилення вільного члена прямої (a), знайдене методом найменших квадратів.

2. *Прийнятне значення* вільного члена. Це поняття в разі МПП замінює поняття «*Практична незначущість* вільного члена», яке застосовується для методу стандарту (див. розділ 4).

У разі методу стандарту вільний член є незначущим, якщо спричинена ним систематична похибка є незначущою порівнюючи з максимально допустимою невизначеністю методики аналізу $\max \Delta_{As}$. У разі МПП на стадії розробки методики ця вимога також застосовна, і реалізацією цієї вимоги є співвідношення (7.12).

Однак на стадії валідації методики МПП для зовнішнього аналізу (тобто на іншому, невідомому спектрофотометрі) доводиться рахуватися, як це показано в розділі 7.7.2, із систематичною похибкою δ_A , яка може досягати, відповідно до Табл. 7.1, дуже великих величин.

Систематичній похибці δ_A (яка є головною частиною повної систематичної похибки δ_{tot}) відповідає вільний член $a_{\delta A}$, абсолютне значення якого, з урахуванням (7.15), відповідає співвідношенню:

$$|a_{\delta A}| \leq \max \delta_A \leq \max \delta_{tot} = 0.71 \cdot \max \Delta_{As}. \quad (7.27)$$

З порівняння співвідношень (7.12) і (7.27) видно, що $a_{\delta A}$ залежить тільки від $\max \Delta_{As}$, тоді як a_{line} залежить також від діапазону, тобто X_L . Величини a_{line} і $a_{\delta A}$ мають випадковий характер одна щодо одної, тому вимоги до підсумкового вільного члена a мають вигляд:

$$\text{вимога прийнятності: } |a| \leq \sqrt{\max a_{line}^2 + \max a_{\delta A}^2}. \quad (7.28)$$

Говорити про практичну незначущість вільного члена a в разі МПП (співвідношення (7.28)) не можна. Аналогічна ситуація в методі калібрувального графіка (див. розділ 6). Правильніше говорити про *прийнятність величини a* .

Ураховуючи це, у разі МПП вільний член a можна вважати прийнятним для розв'язання поставленого завдання, якщо спричинена ним систематична похибка не перевищує вимог співвідношення (7.28), де величини a_{line} і $a_{\delta A}$

відповідають вимогам (7.12) і (7.27). Результати розрахунків величин a за співвідношеннями (7.12, 7.27, 7.28) наведені в Табл. 7.2.

Як і в методі стандарту, вимогу прийнятності (7.28) застосовують тільки в тому разі, коли не виконується критерій статистичної незначущості (7.26).

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

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

Відповідно до розділу 4.4.3.4, DL і QL можуть бути розраховані зі стандартного відхилення вільного члена лінійної залежності s_a і її кута нахилу b :

$$\text{МПП:} \quad DL = 3.3 \cdot s_a / b. \quad (7.29)$$

$$\text{МПП:} \quad QL = 10 \cdot s_a / b. \quad (7.30)$$

7.10. Дослідження стабільності розчинів

Перевірка стабільності досліджуваного розчину і розчину порівняння є одним з елементів дослідження робастності методики (див. розділ 2.3.7) і має проводитися перед початком усіх інших валідаційних досліджень. Зазвичай необхідно показати, що розчини є стабільними протягом не менше 1 год (див. розділ 2.3.7). Це означає, що спричинена їх нестабільністю систематична похибка δ_t має бути незначущою порівнюючи з максимально допустимою повною невизначеністю методики аналізу $\max \Delta_{As}$, тобто:

$$\delta_t \leq 0.32 \cdot \max \Delta_{As}. \quad (7.31)$$

У разі спектрофотометричного аналізу у варіанті МПП необхідно показати, що змінення протягом 1 год оптичної густини випробовуваного розчину в нормалізованих координатах (тобто змінення величини Y зі співвідношення (7.4)) відповідає вимогам (7.31). Для цього проводять паралельне вимірювання їх оптичних густин через $t = 0, 15, 30, 45$ і 60 хв, розраховують за рівнянням (7.4) величини Y_t , їх стандартне відхилення RSD_t (%) і довірчий інтервал Δ_t (%) (однобічний коефіцієнт Стьюдента для 4 ступенів свободи і ймовірності 0.95 дорівнює 2.13), який має відповідати вимогам співвідношення (7.31), тобто:

$$\Delta_t(\%) = 2.13 \cdot RSD_t \leq 0.32 \cdot \max \Delta_{As}. \quad (7.32)$$

Величина $\max \Delta_{As}$ знаходиться за співвідношеннями (7.2-7.3).

7.11. Прогноз повної невизначеності методики кількісного визначення

Прогноз повної невизначеності методики аналізу можна проводити звичайним способом (див. розділ 4.4) за співвідношенням (7.1) з використанням співвідношень (7.7-7.9, 7.11, 7.13) і покладаючи $\Delta_{FAO} = 0.49\%$ (див. розділ 7.5). Такий прогноз можливий тільки для синтетичних субстанцій і ГЛЗ, де невизначеність пробопідготовки зводиться до невизначеності розбавлення, тобто виконується співвідношення (7.8).

Однак слід зазначити, що величина δ_{line} апіорно невідома, що ускладнює використання такого підходу. Більш коректним є застосування співвідношення (7.15), в якому для δ_{tot} (оскільки воно невідоме) слід взяти граничне значення $\max \delta_{tot}$, яке беруть із Табл. 7.2, а для Δ_{prec} використовувати співвідношення:

$$\Delta_{prec}^2 = \Delta_{SP}^2 + \Delta_{FAO}^2. \quad (7.34)$$

Невизначеність градування Δ_{SP} розраховують звичайним способом (див. розділ 4.5), а для Δ_{FAO} покладають $\Delta_{FAO} = 0.49\%$ (див. розділ 7.5). У цьому разі співвідношення (7.15) набуває вигляду:

$$\Delta_{As}^2 \leq \max \delta_{tot}^2 + \Delta_{SP}^2 + \Delta_{FAO}^2 \leq \max \Delta_{As}^2. \quad (7.35)$$

Прогнозована повна невизначеність результатів аналізу не має перевищувати максимально допустиму невизначеність результатів аналізу $\max \Delta_{As}$ (Табл. 7.2).

7.12. Внутрішньолабораторна прецизійність

Дослідження внутрішньолабораторної прецизійності для методик у варіанті методу стандарту з використанням підтверджуючого підходу (див. розділ 4.4.1) — довірчий інтервал нормалізованих величин Z (див. співвідношення (7.4)), отриманих у різних умовах, не має перевищувати максимально допустиму невизначеність методики аналізу $\max \Delta_{As}$. Для цього аналізують за методикою специфікації $n = 5$ зразків (наважок) тієї самої серії досліджуваного препарату в $m = 3$ різні дні. Дослідження проводять різні аналітики, на різному обладнанні (спектрофотометри, кювети, мірний посуд). Усі отримані результати (Z_i) мають належати тій самій генеральній сукупності. Тому для них розраховують об'єднане середнє значення (Z_{intra}), стандартне відхилення ($SD_{Z-intra}$, %) і відносний довірчий інтервал (Δ_{intra} , %) (див. розділ 4.4.4). Величина Δ_{intra} не має перевищувати $\max \Delta_{As}$ із рівнянь (7.2-7.3) і Табл. 7.2, тобто:

$$\Delta_{intra} = t[95\%, (n \cdot m - 1)] \cdot SD_{Z-intra} \leq \max \Delta_{As}. \quad (7.36)$$

Цей підхід, який добре зарекомендував себе для ГЛЗ (див. розділ 4), стає, однак, невизначеним для кількісного визначення субстанцій. Причиною є невизначеність поняття «5 зразків» для субстанції. Це що, різні серії субстанції? Але вони можуть мати різний вміст домішок, що може впливати на результати кількісного визначення і не дозволяє отримати вибірку з тієї самої генеральної сукупності. Крім того, у разі аналізу ГЛЗ різні зразки (модельні суміші) мають різну концентрацію в межах аналітичного діапазону. У разі ж субстанцій ми перевіряємо тільки для однієї якоїсь точки діапазону, оскільки поняття «модельна суміш» для субстанцій відсутнє. Очевидно, що для підтвердження внутрішньолабораторної прецизійності ми маємо аналізувати різні розбавлення тієї самої субстанції у різні дні.

Тому доцільно використовувати інший підхід. Він полягає в тому, що валідаційні дослідження повторюють в інший день на тому самому спектрофотометрі. Отримані результати мають задовольняти розглянуті вище критерії лінійності, правильності і прецизійності. Крім того, об'єднана вибірка з 18 точок має задовольняти вимоги до прецизійності (7.18), тобто:

$$\Delta_{\text{intra}} = t[95\%, 17] \cdot SD_{Z\text{-intra}} = 1.76 \cdot SD_{Z\text{-intra}} \leq \max \Delta_{\text{prec}} = 2.1\% . \quad (7.36)$$

Перевагою такого підходу є те, що внутрішньолабораторна прецизійність підтверджується для всього аналітичного діапазону на двох незалежних експериментах, а також на об'єднаній (удвічі більш представницькій) вибірці.

Виникає питання, чому дослідження внутрішньолабораторної прецизійності слід проводити на тому самому спектрофотометрі? Річ у тім, що оптична густина на різних спектрофотометрах може різнитися на достатньо значну похибку калібрування δ_A (допустиму за Фармакопеею) (див. Табл. 7.1). Для рандомізації цієї похибки двох спектрофотометрів мало, необхідно щонайменше п'ять. Однак це вже міжлабораторний експеримент (для якого в співвідношенні (7.36) замість $\max \delta_{\text{prec}}$ слід брати $\max \Delta_{As}$). Тому для доведення внутрішньолабораторної прецизійності цей підхід є більш виправданим (адже в тій самій лабораторії аналіз проводиться на тому самому спектрофотометрі). Зазначимо, що такої проблеми в методі стандарту немає — за відсутністю похибки калібрування δ_A .

Також слід зазначити, що, у зв'язку з обов'язковістю GMP, контроль якості субстанцій проводиться практично виключно на підприємствах, тобто в межах однієї лабораторії.

Типовий приклад валідації методики кількісного визначення у варіанті методу показника поглинання наведений в Прикладі 4.