

8. КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ПІД ЧАС ДОСЛІДЖЕННЯ БІОЕКВІВАЛЕНТНОСТІ *IN VITRO*

Під час дослідження біоеквівалентності генеричних лікарських препаратів *in vitro* широко застосовується вивчення профілів їх розчинення (ПР). Проведення валідації методики кількісного визначення (КВ) для вивчення ПР має сенс лише тоді, коли вже проведена валідація методик КВ для випробувань «Кількісне визначення» і «Розчинення». Водночас вже вирішені питання, пов'язані зі специфікою самого методу і залишаються нерозв'язаними переважно питання, пов'язані зі специфікою дослідження власне ПР.

Дослідження ПР проводиться в значно ширшому аналітичному діапазоні, ніж випробування «Розчинення» і «Кількісне визначення», що ускладнює застосування методу стандарту, який зазвичай використовується для цієї аналітичної процедури. Крім того, у випробуванні «Розчинення» визначення ступеня вивільнення проводиться в одній часовій точці (зазвичай 45 хвилин) і в умовах, близьких до рівноважних. Під час дослідження ПР визначення ступеня вивільнення проводиться в декількох часових точках і в нерівноважних умовах, що збільшує невизначеність результатів. Загалом, методика КВ для дослідження ПР має узгоджуватися з методикою випробувань «Кількісне визначення» і «Розчинення».

8.1. Метрологічні вимоги до вивчення профілів розчинення *in vitro*

Під час вивчення ПР зазвичай досліджують по 12 зразків досліджуваного і референтного препаратів. Стандартні відхилення від середнього значення, у відсотках до номінального вмісту досліджуваної речовини в дозованій формі, для кожного з цих препаратів мають бути не більше 20 % для першої часової точки контролю і не більше 10 % для інших точок контролю. Ураховуючи значення коефіцієнта Стьюдента $t(95\%, 11) = 1.80$, це відповідає довірчим інтервалам розсіювання 35.9 % для першої точки і 18.0 % для інших точок. Відповідно до принципу незначущості (див. розділ 4.4.1), повна невизначеність методики КВ ($\max \Delta_{As}$) під час вивчення ПР має задовольняти такі вимоги (у відсотках до номінальної концентрації):

$$\text{ПР: 1-а точка} \quad \Delta_{As} \leq \max \Delta_{As} = 0.32 \times 35.9 = 11.5\%. \quad (8.1)$$

$$\text{ПР: інші точки} \quad \Delta_{As} \leq \max \Delta_{As} = 0.32 \times 18.0 = 5.7\%. \quad (8.2)$$

Відповідно до вимог Табл. 4.1, для коректного проведення випробування «Розчинення» невизначеність методики КВ має задовольняти співвідношення $\Delta_{As} \leq \max \Delta_{As} = 3.0\%$, яке значно жорсткіше вимог (8.1-8.2).

Якщо методика використовується одночасно для вивчення кінетики і для випробування «Розчинення», то необхідно витримати вимоги для випробування «Розчинення», тобто:

кінетика + випробування $\Delta_{As} \leq \max \Delta_{As} = 3.0\%$. (8.3)
«Розчинення»:

У цьому разі максимально допустима систематична похибка має витримувати вимоги:

$$\delta \leq \max \delta = 0.32 \times 3.0 = 1.0\%. \quad (8.4)$$

8.2. Аналітичний діапазон, число точок прямої і модельні розчини

Ураховуючи вимоги до однорідності вмісту і той факт, що перша (нижня) часова точка вимірювання зазвичай вище 20 % ступеня вивільнення, можна для вивчення ПР рекомендувати аналітичний діапазон 20-120 % від номінального вмісту.

Діапазон 20-120 % значно ширше зазвичай використовуваного під час валідації методик кількісного визначення (80-120 %) (див. Табл. 4.1). Тому доцільно збільшення числа точок калібрувальної прямої (4.2) до 11, що дозволить дещо полегшити критерії лінійності. Отже, досліджувані концентрації у нормалізованих координатах (4.1) мають вигляд:

аналітичний $X = 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110 \text{ і } 120 \%$ (8.5)
діапазон: від номінального значення

Цей діапазон характеризується номінальним стандартним відхиленням (4.3):

$$SD_{range} \leq 33.2\%. \quad (8.6)$$

Величина SD_{range} використовується для розрахунку граничного значення коефіцієнта кореляції.

Під час приготування модельних розчинів (8.5) у кожний модельний розчин добавляють на останній стадії приготування таку кількість розчину плацебо, яка відповідає номінальному співвідношенню цільових і допоміжних речовин у препараті.

8.3. Вимоги до лінійності

Ураховуючи значення коефіцієнта Стюдента $t(95\%, 9) = 1.83$ (9 — число ступенів свободи прямої з 11 точок), із співвідношення (8.3) отримаємо вимоги до залишкового стандартного відхилення прямої:

$$SD_{rest} \leq 3.0 / 1.83 = 1.6\%. \quad (8.7)$$

Із співвідношень (8.6-8.7) отримаємо вимоги до коефіцієнта кореляції прямої (4.2):

$$\begin{aligned} R_c &\leq 0.99878. \\ R_c^2 &\leq 0.99757. \end{aligned} \quad (8.8)$$

Ураховуючи високі значення коефіцієнта кореляції R_c , зручніше використовувати його квадрат R_c^2 .

Вимоги до статистичної і практичної незначущості (див. розділ 4.4.2) вільного члена a лінійної залежності (4.2) даються співвідношеннями (8.9-8.10):

статистична незначущість:

$$a \leq t(95\%, g - 2) \times s_a = 1.83 \times s_a. \quad (8.9)$$

Із співвідношення (8.5) видно, що $X_{min} = 20\%$. Ураховуючи також вимоги (8.4) до систематичної похибки, отримуємо вимоги до практичної незначущості вільного члена прямої (4.2) у нормалізованих координатах (див. розділ (4.1)):

практична незначущість:

$$a \leq \left| \frac{\max \delta}{1 - (X_{min} / 100)} \right| = 1.2\%. \quad (8.10)$$

Водночас, згідно з (8.5), $X_{min} = 20\%$.

Вимоги практичної незначущості (8.10) застосовують під час недотримання вимоги (8.9) статистичної незначущості.

8.4. Межа кількісного визначення (QL)

QL розраховують за співвідношенням (4.20). Під час валідації методик КВ (діапазон 80-120 %) ця характеристика має інформаційний характер. Однак у цьому разі вона має важливе значення, оскільки нижня межа діапазону (20-120 %) мала.

Величина $\max \Delta_{As}$ має бути незначущою порівнюючи з QL , тобто:

$$\max \Delta_{As} = 0.32 \times QL. \quad (8.11)$$

Звідси, ураховуючи (8.3), отримуємо:

$$QL \leq 9.3\%. \quad (8.12)$$

8.5. Специфічність

Систематичну похибку в результаті кількісного визначення вносить плацебо.

Частка аналітичного сигналу (оптична густина в спектрофотометрії або висота або площа піка в хроматографії) плацебо препарату ($S_{placebo}$) на місці піка (або довжини хвилі) цільової речовини до аналітичного сигналу

стандартного розчину цільової речовини не має перевищувати максимально допустимої величини систематичної похибки (8.4), тобто:

$$100 \times \frac{S_{\text{placebo}}}{S_{st}} \leq \delta = 1.0\%. \quad (8.13)$$

8.6. Метрологічні характеристики результатів

Для вивчення збіжності використовують результати, отримані під час дослідження лінійності. Водночас досліджують невизначеність величини $Z = 100 \times Y / X$, яка являє собою знайдену концентрацію у відсотках до введеної (див. (4.1)). Однак використання величини Z є коректним тільки для достатньо вузького аналітичного діапазону, в якому можна припустити приблизну постійність *відносної* невизначеності. У разі характерного для вивчення ПР широкого діапазону 20-120 % це припущення явно некоректне. Тут коректніше використовувати припущення приблизної постійності *абсолютної* невизначеності. Зазначимо, що саме це припущення використовується під час обрахунку прямої (4.2) методом найменших квадратів.

Отже, завдання валідації нашої методики формулюється так: у нормалізованих координатах вона має характеризуватися однаковою невизначеністю не вище 3.0 % до номінального значення в усьому аналітичному діапазоні 20-120 %.

Для оцінки цієї невизначеності введемо величину:

$$\Delta Z_i = Y_i - X_i. \quad (8.14)$$

У тому разі, коли вільний член a лінійної залежності (4.2) незначуще (статистично або практично) відрізняється від нуля (тобто пряма (4.2) проходить через початок координат), величина Y у нормалізованих координатах являє собою знайдене значення концентрації. Тому величина ΔZ_i рівняння (8.14) являє собою різницю знайденої (Y_i) і введеної (X_i) концентрацій у відсотках до номінальної концентрації.

8.6.1. Правильність

Середнє значення величини ΔZ_i має статистично або практично незначуще відрізнятись від нуля, тобто для $g = 11$ отримаємо:

статистична незначущість:

$$\Delta Z = \left| \overline{\Delta Z}_i \right| \leq \frac{t(95\%, g-1)}{\sqrt{g}} \times SD_{\Delta Z_i} = 0.55 \times SD_{\Delta Z_i}. \quad (8.15)$$

У разі невиконання співвідношення (8.15) статистичної незначущості можна застосувати вимогу практичної незначущості — середнє значення

величини ΔZ_i не має перевищувати максимально допустиме значення систематичної похибки зі співвідношення (8.4), тобто:

практична
$$\Delta Z = |\overline{\Delta Z_i}| \leq \delta = 1.0\%.$$

незначущість: (8.16)

8.6.2. Збіжність результатів

Ураховуючи (6.20-6.21), невизначеність величини ΔZ_i не має перевищувати максимально допустиму невизначеність методики аналізу зі співвідношення (8.3), тобто:

$$\Delta_{\Delta Z_i} = t(95\%, g - 1) \times SD_{\Delta Z_i} = 1.812 \times SD_{\Delta Z_i} \leq 3.0\%. \quad (6.22)$$

8.6.3. Внутрішньолабораторна прецизійність

Ще однією особливістю валідації методик аналізу для опису вивільнення є неможливість перевірити внутрішньолабораторну прецизійність у звичайному її розумінні. У звичайному випадку для доведення внутрішньолабораторної прецизійності аналізують декілька зразків того самого препарату в різні дні, об'єднують отримані результати і розраховують відносне стандартне відхилення і відносний довірчий інтервал, який не має перевищувати $\max \Delta_{As}$. У нашому разі такий підхід не застосовний, оскільки різні таблетки тієї самої серії, які відповідають специфікації, можуть різнитися між собою за концентрацією до 30 % (через неоднорідність вмісту) і мати до того ж різну швидкість розчинення. Тобто ми будемо перевіряти не методику, а якість технології препарату. Крім того, за такого підходу ми перевіряємо внутрішньолабораторну прецизійність для КВ тільки якоїсь однієї концентрації, а не всього аналітичного діапазону.

Тому для доведення внутрішньолабораторної прецизійності можна запропонувати повторити валідаційне дослідження в інший день. Отримані результати мають задовольняти запропоновані вище критерії, що і є доказом внутрішньолабораторної прецизійності. Зазначимо, що таким способом ми перевіряємо прецизійність не однієї якоїсь концентраційної точки, а всього аналітичного діапазону концентрацій.

Типовий приклад валідації методики кількісного визначення під час вивчення біоеквівалентності *in vitro* наведений у *Прикладі 5*.