

11. ОСОБЛИВОСТІ ВАЛІДАЦІЇ МЕТОДИК КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ СУМАРНИХ ПРЕПАРАТІВ

Стандартизовані процедури валідації кількісних методик у варіантах методу стандарту, калібрувального графіка (МКГ) і показника поглинання описані в попередніх розділах. Однак пряме застосування цих процедур до валідації методик кількісного визначення сумарних препаратів нашо́вхується на низку труднощів, пов'язаних з особливостями стандартизації цих препаратів.

Процес валідації полягає в отриманні валідаційних характеристик (див. розділи 1.3-1.4), порівнянні їх із валідаційними критеріями (див. розділ 4.4) і висновку про придатність методики для виконання поставлених завдань.

У разі сумарних препаратів основні валідаційні характеристики є невизначеними, що ускладнює проведення валідації.

11.1. Що таке сумарні препарати

Сумарні препарати — це такі лікарські засоби, біологічна активність яких пов'язана з великою кількістю хімічних сполук, багато з яких можуть бути невідомі (або відомі тільки як класи хімічних сполук), і їх концентрації (як абсолютні, так і відносні) можуть коливатися в широких межах. Ці концентрації визначаються властивостями сировини і технології і не можуть бути змінені за бажанням.

Типовими представниками сумарних препаратів є, наприклад, лікарська рослинна сировина (ЛРС) і різні екстракти з неї.

До сумарних препаратів належить також і більшість біопрепаратів, які порівнюючи з ЛРС мають додаткову специфіку.

Зокрема, фармакологічний ефект біопрепаратів пов'язаний із великою кількістю різних факторів і його стандартність забезпечується суворим дотриманням технологічного процесу. Якість сумарних біопрепаратів характеризується сукупністю показників, кожен з яких окремо може й не бути прямо пов'язаний з активністю, але вихід цього показника за допустимі межі свідчить про порушення технології виготовлення, умов зберігання або про деградацію, а отже, про порушення якості. Тому ці показники можна розглядати як сигнальні, або маркерні.

Така ситуація тією чи іншою мірою характерна для всіх сумарних препаратів, але для сумарних біопрепаратів особливо. Це призводить до того, що ці (сигнальні) показники можуть бути просто характеристиками якості навіть у тому разі, коли вони являють собою кількісне визначення суми якихось груп хімічних сполук. Це впливає і на проведення валідації методик їх кількісного визначення.

Далі будуть розглядатися питання валідації кількісних методик аналізу тих сумарних препаратів, для яких відсутні значущі ефекти неоднорідності і ступеня витягнення. Це розчини, настойки, екстракти тощо. Об'єкти, для яких ці ефекти

є значущими (це передусім лікарська рослинна і тваринна сировина), потребують окремого розгляду, оскільки оцінка цих ефектів виходить за межі звичайних цілей валідації методик (див. розділ 1).

11.2. Невизначеність поняття «концентрація»

Фармакологічна активність сумарних препаратів пов'язана з різними групами хімічних сполук (флавоноїди, каротиноїди тощо). Для стандартизації цієї активності концентрації цих груп сполук мають бути стандартизовані. У межах кожної групи сполуки різняться не тільки за фармакологічною активністю (іноді в десятки разів), але й також за хімічною структурою і фізико-хімічними властивостями (спектральними, хроматографічними, кислотно-основними тощо).

Це ускладнює (а в багатьох випадках робить безглуздим) кількісне визначення фактичної суми конкретної групи сполук. Тому зазвичай визначають суму сполук у перерахунку на якусь одну сполуку, прийняту за референтну (наприклад, сума флавоноїдів у перерахунку на гіперозид). Водночас стандартизація проводиться за якоюсь фізико-хімічною властивістю референтної сполуки, наприклад її оптичним поглинанням за якоїсь аналітичної довжини хвилі.

Якщо вибрати іншу референтну сполуку або просто змінити аналітичну довжину хвилі, то ми отримаємо інше значення цієї «суми сполук». Тому отримана таким шляхом «сума флавоноїдів у перерахунку на гіперозид» є сумою умовних, а не істинних концентрацій, тобто просто якоюсь характеристикою якості препарату. Це призводить до суттєвої зміни цілей валідації таких методик.

11.3. Різниця між розробкою аналітичної методики і її валідацією

Одна з головних цілей методики кількісного визначення (або контролю домішок) лікарського засобу (ЛЗ) — це коректна оцінка якості цього ЛЗ. У разі синтетичних ЛЗ вона зазвичай зводиться до встановлення вмісту речовини, що аналізується.

Мета валідації аналітичної методики полягає в демонстрації того, що вона придатна для свого передбачуваного застосування (див. розділ 1.1).

Як видно, цілі достатньо різні. Зокрема, на стадії валідації не розв'язуються питання об'єктивності методики (наприклад, вибір групи сполук, що аналізуються, і референтної речовини), оптимальності умов аналізу (наприклад, вибір довжин хвиль, умов екстракції і проведення реакції) тощо. Усі ці питання мають розв'язуватися на стадії розробки методики. Завдання валідації полягає в тому, щоб перевірити, наскільки валідаційні характеристики (див. розділи 1.3-1.4) розробленої методики відповідають валідаційним критеріям.

Відмінність між цілями розробки методики і її валідацією проявляється під час контролю якості синтетичних ЛЗ, але у разі сумарних препаратів, ця відмінність особливо помітна. Зокрема, на стадії розробки методики може бути вибраний контроль суми сполук, які мало пов'язані (або взагалі не пов'язані) з біологічною активністю. Як референта сполука (на яку перераховується сума сполук) може бути вибрана речовина, яка взагалі відсутня в цьому сумарному препараті. Розроблена таким способом методика може погано або взагалі не контролювати якість сумарного препарату. Але ця методика може відповідати вимогам до валідаційних характеристик, тобто бути валідованою.

У разі біопрепаратів (і нерідко рослинних ЛЗ), як вже зазначалося вище, значна частина показників якості (зокрема, і кількісних) є сигнальною, тобто самі вони мало пов'язані з біологічною активністю, але їх вихід за регламентовані межі свідчить про порушення технології, тобто про можливе порушення якості препарату.

Цю відмінність між цілями розробки методики і її валідацією слід урахувувати під час проведення валідації.

Зазначимо, що зазвичай суму умовних концентрацій у сумарних препаратах визначають методом спектрофотометрії, який і буде далі розглядатися як головний. Отримані висновки застосовні і до інших методів.

Мета валідації аналітичної методики полягає в демонстрації того, що вона придатна для свого передбачуваного застосування (див. розділ 1.1). Основними етапами валідації є отримання валідаційних характеристик, порівняння їх з критичними значеннями і висновок про коректність методики. Одними з найважливіших характеристик є «діапазон застосування», «специфічність» і «правильність», які так само спираються на максимально допустиму невизначеність методики кількісного визначення $\max \Delta_{As}$.

11.4. Діапазон застосування і допуски вмісту для сумарних препаратів

Діапазон застосування методики є необхідним під час дослідження лінійності (розділ 2.4) і визначається як 80-120 % від номінального вмісту.

Характерною особливістю кількісного визначення сумарних препаратів є те, що для них, як правило, нормується тільки нижня межа допуску вмісту $Cont_L$ (тобто $\leq Cont_L$). Отже, для них не існує номінального вмісту $Cont_{nom}$, що ускладнює встановлення максимально допустимої невизначеності методики кількісного визначення ($\max \Delta_{As}$), а також діапазону застосування, в якому проводиться валідація (оскільки він визначається у відсотках від номінальної концентрації — див. розділ 2.4).

Здавалося би, за номінальну концентрацію $Cont_{nom}$ можна узяти нижню межу допуску $Cont_L$. Однак це суперечить загальним принципам стандартизації лікарських засобів (ЛЗ). Зокрема, у цьому разі неможливо було б випускати лікарські засоби з номінальним вмістом, оскільки ймовірність того, що це буде

брак (тобто ймовірність того, що отримана під час аналізу в контрольній лабораторії концентрація буде менше $Cont_{nom}$), становить 50 %.

Одним із можливих шляхів виходу з цієї ситуації є введення формальної номінальної концентрації і формальних двобічних допусків вмісту.

У тому разі, коли встановлюються однобічні допуски вмісту цільової групи сполук, коливання їх вмісту в сумарному препараті можуть бути дуже значними. Відповідно, невисокими є і вимоги до максимально допустимої невизначеності методики їх кількісного визначення ($max \Delta_{As}$). Як величину $max \Delta_{As}$ в цьому разі можна вважати максимально допустиму невизначеність методики кількісного визначення будь-яких лікарських засобів $max \Delta_{As}^0$. Саме значення $max \Delta_{As}^0$ можна отримати із фармакопейних вимог до однорідності вмісту.

Вимоги до відносного стандартного відхилення під час проведення випробування на однорідність вмісту встановлені на підставі умови, що генеральне його значення не має перевищувати 10 %. Для розподілу Стюдента, двобічних критеріїв і ймовірності 95 % це відповідає допускам вмісту ± 20 %. Ці допуски можна розглядати як граничні для ЛЗ. Їх і можна рекомендувати для встановлення формальних двобічних допусків вмісту у разі однобічного нормування. Тоді номінальний вміст $Cont_{nom}$ пов'язаний із нижнім допуском вмісту $Cont_L$ співвідношенням:

$$Cont_{nom} = 100 \times Cont_L / (100 - 20) = Cont_L / 0.8. \quad (11.1)$$

Відповідно, максимально допустима невизначеність ($max \Delta_{As}$) методики кількісного визначення в цьому разі дорівнює (див. співвідношення (4.8-4.9):

$$B = 20\%. \\ \max \Delta_{As} = \max \Delta_{As}^0 = 0.32 \times B = 6.4\%. \quad (11.2)$$

Тут B — піврізниця верхнього і нижнього допусків у відсотках до номінального вмісту.

11.5. Правильність

Правильність (accuracy, trueness) характеризує ступінь відповідності між відомим справжнім значенням або довідковою величиною і значенням, одержаним за цією методикою (див. розділ 1.4.3).

Це визначення, яке є однозначним для синтетичних препаратів, втрачає сенс для сумарних препаратів.

Як вже зазначалося в розділі 11.2, у разі кількісного визначення сумарних препаратів (наприклад, методом спектрофотометрії) знаходиться сума умовних концентрацій у перерахунку на якийсь один компонент (наприклад, сума вуглеводнів у перерахунку на глюкозу). Залежно від вибору цього компонента, довжини хвилі, умов проведення аналізу тощо, результати будуть одержуватися

різні. Тому «справжнього значення» або «довідкової величина» для суми умовних концентрацій у сумарних препаратах не існує. Неможливо також провести порівняльний аналіз іншим методом (наприклад, хроматографією), оскільки результати аналізу будуть значуще різнитися.

Ураховуючи також, що всередині тієї самої цільової групи сполук різниця за біологічною активністю може бути дуже великою (наприклад, у разі кількісного визначення суми вуглеводнів — між моно- і полісахаридами), сума умовних концентрацій у сумарних препаратах є просто сигнальною характеристикою їх якості. Говорити про правильність цієї величини некоректно. Можна говорити тільки про її відтворюваність у різних лабораторіях, що є обов'язковою умовою застосування цієї величини як характеристики якості.

Важливо зазначити, що питання про те, наскільки вибрана сума умовних концентрацій коректно відображає якість сумарного препарату, вирішується не на стадії валідації, а на стадії розробки і обґрунтування вибору методики. Крім того, як вже йшлося вище, для сумарних біопрепаратів ці характеристики часто є сигнальними і вихід їх за допуски специфікації свідчить про порушення технології, умов зберігання або деградацію.

Отже, валідаційна характеристика «правильність» для сумарних препаратів відсутня.

11.6. Специфічність

Специфічність — це здатність однозначно оцінювати аналізовану речовину в **присутності** інших компонентів, які можуть бути в зразку. Це можуть бути домішки, продукти розкладу, допоміжні речовини тощо (див. розділ 1.4.2).

Це визначення не викликає сумнівів для синтетичних препаратів точно відомого складу. У цьому разі специфічність оцінюється і кількісно — внесок нецільових компонентів в аналітичний сигнал (оптична густина, площа піка тощо) має бути незначущим порівнюючи з максимально допустимою невизначеністю аналітичної методики ($max \Delta_{As}$) (див. співвідношення (4.24)).

У разі сумарних препаратів поняття специфічності стає достатньо невизначеним. Для контролю цільової групи хімічних сполук у сумарних препаратах методом спектрофотометрії зазвичай використовують кольорові реакції (рідше власне поглинання) цих сполук із груповим реактивом із подальшим вимірюванням оптичної густини за аналітичної довжини хвилі. Здавалося би, для кількісної оцінки специфічності методики аналізу сумарних препаратів можна застосувати той самий підхід, що й для синтетичних препаратів. Однак у разі сумарних препаратів вилучити з препарату цільову групу сполук (щоб одержати «чисте плацебо») зазвичай неможливо, а отже, неможливо оцінити і внесок нецільових компонентів. А груповий реактив (не кажучи вже про методики, які ґрунтуються на власному поглинанні) може

давати поглинання за аналітичної довжини хвилі не тільки із заявленою цільовою групою хімічних сполук.

Наприклад, у разі кількісного визначення суми вуглеводнів (див. *Приклад 8*), метод Дрейвуда ґрунтується на дегідратації моносахаридів до оксиметилфурфуролу, який і взаємодіє з антроном. Як видно, похідні оксиметилфурфуролу також будуть утворювати забарвлення з антроном. Тому, строго кажучи, правильно говорити, що кількісно визначається не «сума вуглеводнів», а «сума сполук, які дають з антроном поглинання за довжини хвилі 620 нм». Така сама ситуація зазвичай спостерігається і з іншими спектрофотометричними методиками визначення суми цільової групи сполук у сумарних препаратах.

Ураховуючи наведене вище, у разі використання групового реактиву для кількісного визначення цільової суми умовних концентрацій для характеристики специфічності можна використати поглинання самого вихідного препарату (без реактиву) за аналітичної довжини хвилі (λ). Тобто відношення оптичної густини за цією довжиною хвилі досліджуваного зразка без реактиву (A_λ) до оптичної густини цього самого зразка після реакції із груповим реактивом за вирахуванням бланка (A_o) має бути незначущим порівнюючи з максимально допустимою невизначеністю методики аналізу ($\max \Delta_{As}$), тобто з урахуванням співвідношення (11.2):

$$\text{специфічність:} \quad \frac{A_\lambda}{A_o} \times 100 \leq \max \delta = 0.32 \times \max \Delta_{As} = 2.0\%. \quad (11.3)$$

Зокрема, у разі методики визначення вуглеводнів за реакцією з антроном (див. *Приклад 8*) відношення оптичної густини досліджуваного зразка за довжиною хвилі $\lambda = 620$ нм без реактиву (A_λ) до оптичної густини за довжиною хвилі 620 нм того самого зразка після реакції з антроном за вирахуванням бланка (A_o) має бути незначущим порівнюючи з максимально допустимою невизначеністю методики аналізу ($\max \Delta_{As}$) — див. співвідношення (11.3).

11.7. Лінійність

11.7.1. Проблеми дослідження лінійності під час кількісного визначення сумарних препаратів

Характерною особливістю аналізу сумарних препаратів у варіантах як методу стандарту, так і методу калібрувального графіка є те, що в їх аналізі фігурують дві речовини — випробовувана проба і стандартний зразок, аналітичні характеристики (зокрема, лінійність у діапазоні валідації) якого можуть взагалі відрізнятися від випробовуваної проби. Тому, загалом, необхідно перевіряти лінійність як для випробовуваної проби, так і для стандартного зразка.

Для сумарних препаратів досить часто застосовується метод калібрувального графіка (МКГ). Відповідно до рекомендацій розділу 6, у цьому разі завжди

необхідно перевіряти можливість застосування також і простішого методу стандарту, що і буде зроблено далі.

Ситуація ускладнюється ще й тим, що якщо для стандартного зразка концентрації для побудови калібрувального графіка відомі, то для випробовуваного сумарного зразка вихідна концентрація (у разі спектрофотометричних методик — це умовна концентрація) невідома в принципі. Для того щоб її визначити, потрібна валідована методика, а щоб провести валідацію методики, потрібні відомі концентрації. Маємо замкнуте коло.

11.7.2. Нормалізовані координати

Як показано в розділі 6, у разі методу калібрувального графіка (МКГ) нормалізовані координати достатньо застосовувати тільки для осі концентрацій. Однак застосування нормалізованих координат і для осі ординат дозволяє на підставі даних із дослідження лінійності визначити можливість використання замість МКГ простішого методу стандарту.

У методі стандарту (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 їй номінальною оптичною густиною A_{nom} . У цьому разі вирази для нормалізованих координат будуть мати той самий вигляд, що й для методу стандарту (див. співвідношення (6.2)):

$$\begin{aligned} X_i (\%) &= 100 \times C_i / C_{st} \cdot C_{st} = C_{nom} \cdot \\ Y_i (\%) &= 100 \times A_i / A_{st} \cdot A_{st} = A_{nom} \cdot \\ Z_i (\%) &= 100 \times Y_i / X_i \cdot \end{aligned} \tag{11.4}$$

Лінійна залежність для МКГ у нормалізованих координатах має вигляд (див. співвідношення (6.1a)):

$$X = b \times Y + a \tag{11.5}$$

11.7.3. Діапазон і кількість точок прямої для побудови калібрувального графіка

Діапазон дослідження лінійності і метрологічних характеристик під час проведення валідації методики кількісного визначення зазвичай щонайменше вдвічі перевищує допуски вмісту. Зокрема, звичайний фармакопейний діапазон (80-120 %) (див. розділ 4.2) вдвічі ширше максимальних допусків вмісту для більшості готових лікарських засобів ($\pm 10\%$). Тому діапазон 50-150 % від номінального значення $Cont_{nom}$, запропонований раніше (див. розділ 6) для методу калібрувального графіка (МКГ) уявляється цілком виправданим. Число

точок для побудови калібрувального графіка (11.5) за такої умови має бути не менше $n = 5$ (див. розділ 6), що відповідає 50, 75, 100, 125 і 150 % від номінального вмісту $Cont_{nom}$. Водночас $SD_{Co} = 39.53$ % (див. Табл. 6.1). Бажано, щоб номінальний розчин був якнайближче до 100 %.

Зазначимо, об'єми розчину А, які вимірюються для приготування останніх розбавлень калібрувальних розчинів, не будуть охоплювати весь об'єм піпетки. Тому, загалом, доцільно за такої умови використовувати вагові розбавлення. Якщо в мірну колбу об'єму V_{cal} для останнього розбавлення поміщається маса $m_o(cal)$ об'єму розчину А, яка відповідає його прийнятій номінальній концентрації, а маси об'ємів, взятих для інших розбавлень, дорівнюють $m_i(cal)$, то, урахувавши (11.4), нормалізовані концентрації різних розбавлень калібрувальних розчинів будуть такими:

$$X_i(cal) = 100 \times C_i(cal) / C_{st}(cal) = 100 \times m_i(cal) / m_o(cal). \quad (11.6)$$

Концентрації модельних розчинів у мг/мл дорівнюють:

$$C_i(cal) = C_A \times m_i(cal) / (V_{cal} \times \rho_A). \quad (11.7)$$

Тут C_A — концентрація (мг/мл) калібрувального розчину перед останнім ваговим розбавленням у мірній колбі об'єму V_{cal} , ρ_A — густина цього розчину (г/мл).

Оптичні густини калібрувальних розчинів $A_i(cal)$ переводять, урахувавши (11.4), у нормалізовані величини $Y_i(cal)$ за формулою:

$$Y_i(cal) = 100 \times A_i(cal) / A_{st}(cal). \quad (11.8)$$

Тут $A_{st}(cal)$ — оптична густина модельного розчину, узятото за стандарт.

11.7.4. Модельні суміші, їх аналіз і розрахунки

У разі синтетичних лікарських засобів використовують $n = 9$ модельних розчинів із концентраціями (див. розділ 6) 50.0, 62.5, 75.0, 87.5, 100.0, 112.5, 125.0, 137.5 і 150 % від номінальної концентрації, які характеризуються $SD_{Co} = 34.23$ %.

Однак у разі сумарних препаратів приготувати модельні суміші з точно відомим складом зазвичай неможливо. Здавалося б, як модельні суміші можна використовувати різні концентрації стандартного зразка. Однак у цьому разі ми б досліджували кількісне визначення не випробовуваного, а стандартного зразка. Більш коректним уявляється досліджувати різні розбавлення випробовуваного розчину. Водночас необхідно сформулювати завдання, які результати ми хочемо одержати від дослідження різних розбавлень випробовуваного зразка, і розробити відповідні критерії.

Як вже говорилося вище, для сумарних препаратів справжня концентрація (вміст) аналізованої групи сполук не відома, тому відсутня валідаційна

характеристика «правильність». Відповідно, відсутня також така важлива аналітична характеристика, як «знайдено/введено», яка широко застосовується під час валідації методик ААС у варіанті калібрувального графіка (див. розділ 6). Беручи це до уваги, під час проведення валідації методики кількісного визначення сумарних препаратів ми можемо експериментально підтвердити тільки необхідну прецизійність методики.

Завдання дослідження різних розбавлень випробовуваного зразка можна сформулювати так: невизначеність (як довірчий інтервал) розкиду значень концентрацій, розрахованих для $n = 9$ розбавлень того самого зразка препарату в аналітичному діапазоні умовних концентрацій, має відповідати встановленим критеріям.

У попередньому експерименті вибирають розбавлення зразка препарату, яке приблизно відповідає оптичній густині $A_{st}(cal)$ калібрувального розчину, взятого за стандарт (див. вище). Припускаючи приблизну пропорційність оптичної густини від концентрації, отримаємо n розбавлень зразка препарату в діапазоні 50-150 % від цього значення.

Оскільки, відповідно до вимог розділу 4, таких розбавлень має бути не менше $n = 9$, відмірювані об'єми препарату не будуть охоплювати весь об'єм піпетки. Тому, загалом, таким самим способом, як і під час приготування калібрувальних розчинів (див. вище), доцільно у цьому разі використовувати вагові розбавлення. Якщо в мірну колбу об'єму V_b поміщається маса m_o об'єму зразка препарату, яка відповідає його прийнятій номінальній концентрації, а маси об'ємів, взятих для інших розбавлень, дорівнюють m_i , то введені (in) нормалізовані концентрації різних розбавлень зразка препарату будуть такими (див. (11.7)):

$$X_i(in) = 100 \times C_i(in) / C_o(in) = 100 \times (m_i / m_o). \quad (11.9)$$

Величини X_i вибирають близькими до 50, 62.5, 75, 87.5, 100, 112.5, 125, 137.5 і 150 %. Приготування таких модельних розчинів сумарного препарату принципово мало чим відрізняється від приготування звичайних модельних розчинів для синтетичних препаратів.

Розбавлення (Dil_i) модельних зразків препарату у такому разі дорівнюють:

$$Dil_i = V_b \times \rho_s / m_i. \quad (11.10)$$

Тут ρ_s — густина препарату (г/мл), яку необхідно визначити в попередньому експерименті.

Для кожної отриманої концентрації $X_i(in)$ одержують за методикою оптичні густини A_i , які за рівнянням (11.4) переводять у нормалізовані величини Y_i :

$$Y_i = 100 \times A_i / A_{st}(cal). \quad (11.11)$$

Тут $A_{st}(cal)$ — оптична густина калібрувального розчину, взятого за стандарт. За калібрувальним графіком (11.5) за величинами Y_i знаходять розрахункові величини $X_i(out)$.

Концентрації $C_i(sample)$ у мг/мл у зразку препарату, взятого для приготування модельних розчинів, знаходять за формулою:

$$C_i(sample) = X_i(out) \times C_{st}(cal) \times Dil_i / 100. \quad (11.12)$$

Тут $C_{st}(cal)$ знаходять за співвідношенням (11.7) для калібрувального розчину, взятого за стандарт, а Dil_i — за співвідношенням (11.10). Для отриманих величин $C_i(sample)$ знаходять середнє значення C_{sample} , відносне стандартне відхилення одиничного результату (RSD_{sample} , %) і відносний довірчий інтервал Δ_{sample} , який має задовольняти відповідні критерії (див. нижче).

11.7.4.1. Розрахунки для методу стандарту

Використання нормалізованих координат дозволяє також оцінити можливість застосування простішого методу стандарту (див. розділ 6). Для цього параметри калібрувальної залежності (11.5) порівнюють із критеріями, отриманими нами раніше в розділі 6.

11.8. Валідаційні критерії

Сумарна невизначеність кількісного визначення у варіанті МКГ складається з невизначеності калібрувального графіка і невизначеності аналізу випробовуваного зразка. Остання під час аналізу власне зразка виступає як систематична похибка. Як показано в розділі 6, для вибору співвідношення між цими двома невизначеностями можуть застосовуватися різні підходи, з яких для аналітичного діапазону 50-150 % від номінальної концентрації найбільш загальним є *Підхід 2: максимально допустимі невизначеності калібрування й аналізу випробовуваного зразка дорівнюють одне одному*, тобто, з урахуванням співвідношення (11.2), отримаємо (див. співвідношення (6.21) розділу 6):

$$\max \Delta_{cal} = \max \Delta_{sample} \leq 0.71 \times \max \Delta_{As} = 4.5\%. \quad (11.13)$$

Цей підхід буде застосовуватися далі.

11.8.1. Невизначеність калібрувального графіка

Як показано в розділі 6, у разі *Підходу 2* залишкове стандартне відхилення SD_{rest} калібрувальної прямої (11.5) з 5 точок, з урахуванням співвідношення (11.2), має витримувати вимоги співвідношення (6.22), тобто:

$$SD_{rest} \leq \max SD_{rest} = 0.096 \times B = 0.096 \times 20 = 1.9\%. \quad (11.14)$$

Квадрат коефіцієнта кореляції (R_c^2) для діапазону 50-150 % у такому разі має витримувати вимоги (див. Табл. 6.3, діапазон 50-150 %, *Підхід 2*. МКГ):

$$R_c^2 \geq 0.99764. \quad (11.15)$$

Якщо вимоги (11.14-11.15) не виконуються, то така калібрувальна пряма непридатна для проведення коректного аналізу МКГ у межах *Підходу 2* (див. розділ 6).

11.8.2. Невизначеність випробовуваного зразка в методі калібрувального графіка

Як вже говорилося вище, поняття «правильність» під час аналізу сумарних препаратів відсутнє. Тому ми можемо перевірити тільки відтворюваність кількісного визначення концентрацій для $n = 9$ різних розбавлень того самого зразка препарату ($C_i(sample)$) в аналітичному діапазоні концентрацій — див. (11.12).

Отже, відносний довірчий інтервал розкиду величин $C_i(sample)$ навколо середньої величини C_{sample} , отриманої із розрахованих за калібрувальною залежністю (11.5) усіх 9 модельних сумішей (розбавлень) препарату має, урахувавши (11.13), відповідати співвідношенню (див. Табл. 6.3 розділ 6, діапазон 50-150 %, *Підхід 2*. МКГ):

$$\Delta_{sample} = 1.86 \times RSD_{sample} \leq 0.707 \times \max \Delta_{As} = 4.5\%. \quad (11.16)$$

11.8.3. Невизначеність випробовуваного зразка в методі стандарту

Використання нормалізованих координат у МКГ дозволяє оцінити можливість застосування для аналізу простішого методу стандарту (МС) (див. п. 6.7 розділу 6).

Для цього за допомогою методу найменших квадратів отримують лінійну залежність (11.5), в якій Y_i і X_i розраховують за співвідношенням (9.4). Вільний член цієї лінійної залежності має, з урахуванням (11.2), задовольняти співвідношення (див. рівняння (6.10) і Табл. 6.2, діапазон 50-150 %):

метод стандарту:
$$a \leq \frac{0.1 \times B}{1 - (X_{\min} / 100)} = 4.0\%. \quad (11.17)$$

Залишкове стандартне відхилення SD_o і квадрат коефіцієнта кореляції R_c^2 цієї лінійної залежності мають задовольняти вимоги (див. Табл. 6.2, діапазон 50-150 %):

метод стандарту:
$$SD_o \leq 3.4\%; \quad (11.18)$$

метод стандарту:
$$R_c^2 \geq 0.99512. \quad (11.19)$$

Для знайденої концентрації C_{sample} довірчий інтервал, з урахуванням (11.2), має задовольняти співвідношення (див. Табл. 6.2):

метод стандарту:
$$\Delta_{sample} = 1.86 \times SD_Z \leq 0.32 \times B = 6.4\%. \quad (11.20)$$

11.8.4. Внутрішньолабораторна прецизійність

Доцільно використовувати підхід, описаний нами в розділі 6. Проводять по три паралельних аналізи препарату за методикою в два різних дні. Різниця між знайденими в різні дні величинами C_{sample} має, урахуовуючи (11.2), задовольняти співвідношення:

$$\left| \frac{2 \cdot 100 \times [C_{sample}(2) - C_{sample}(1)]}{C_{sample}(2) + C_{sample}(1)} \right| \leq \sqrt{2} \times \max \Delta_{As} / \sqrt{3} = 0.26 \times B = 5.2\%. \quad (11.21)$$

Типовий приклад валідації методики кількісного визначення сумарних препаратів наведений у *Прикладі 8*.