Шановні колеги,

щиро вітаю вас на сторінках наукового журналу «Фармаком»!

З часу заснування у 1992 р. це фахове видання має сильну позицію і власне обличчя. «Фармаком» — перший журнал в Україні, спрямований на стандартизацію якості лікарських засобів. Із впровадженням Державної Фармакопеї України (ДФУ) у 2001 р. одним з головних завдань журналу стала інформаційна підтримка видання ДФУ — публікація проектів монографій, обговорення важливих змін та нових напрямів. Саме у журналі «Фармаком» опубліковані всі основоположні статті, присвячені створенню метрологічної системи ДФУ (стандартизована процедура валідації аналітичних методик, Національна система фармацевтичних стандартних зразків, метрологічне забезпечення якості результатів аналізу та ін.), національної фармакопейної стандартизації лікарської рослинної сировини і рослинних лікарських препаратів, а також національної Програми професійного тестування лабораторій контролю якості лікарських засобів. Висвітлювання підходів ДФУ сприяло їх поширенню й активному застосуванню за межами України.

Журнал «Фармаком» публікує проблемні статті, огляди провідних спеціалістів фармацевтичної галузі, підходи ДФУ до стандартизації якості лікарських засобів, проекти статей ДФУ та національні доповнення до ДФУ, результати оригінальних досліджень у галузі розробки, стандартизації та контролю якості лікарських засобів, зокрема основні наукові результати дисертацій здобувачів наукових ступенів кандидата (доктора філософії) та доктора фармацевтичних наук та дослідження претендентів на присвоєння вчених звань, а також статті, присвячені впровадженню Державної Фармакопеї України. Журнал включено до переліку видань, в яких можуть публікуватися основні результати дисертаційних робіт (наказ МОН України від 11.07.2016 № 820).

Вимоги до наукових фахових видань постійно підвищуються, і ми докладатимемо зусиль для того, щоб їм повністю відповідати.

Як і раніше, журнал буде приймати матеріали українською, російською та англійською мовами, які відповідатимуть редакційним вимогам. Нині вимоги до поданих матеріалів залишаються тими самими, але надалі вони можуть змінюватися відповідно до вимог до наукових фахових журналів. Як і раніше, періодичність журналу залишатиметься 4 рази на рік.

Звертаємо вашу увагу: щоб уможливити посилання на статті, які знаходяться в процесі публікації, матеріали, які було прийнято до публікації, планується розміщувати на веб-сайті ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів» у відповідному розділі із зазначенням дати розміщення.

Для зручності авторів, а також щоб відповідати вимогам до наукових фахових видань, ми плануємо перехід на новий веб-сайт, але водночас копії усіх матеріалів залишатимуться наявними на сайті ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів».

У майбутньому ми плануємо надавати кожному опублікованому матеріалу міжнародний цифровий ідентифікатор DOI (Digital Object Identifier). Крім того, ми плануємо поступово розширювати аудиторію читачів за рахунок індексації журналу в міжнародних базах індексування. Щоб знизити упередженість, ми вводимо політику «сліпого» рецензування, тобто автор статті не знатиме, хто його рецензент.

Особлива увага буде приділятися якості публікацій, їх належному науковому та технічному редагуванню, зворотному зв'язку з авторами, рецензентами та науковцями, щоб відповідати сучасним вимогам і підвищити імідж журналу.

З 2018 р. відновлюється реферування журналу в Українському реферативному журналі «Джерело» (реферувався до 2014 р. включно), зокрема будуть прореферовані статті, які були опубліковані у 2015 – 2017 рр.

Ми запрошуємо науковців України та країн близького та далекого зарубіжжя, які працюють у галузі фармацевтичних та споріднених наук, до публікації у нашому журналі.

Будемо раді почути ваші коментарі, пропозиції й критичні зауваження.

З повагою,
головний редактор,
д. фарм. н. Леонтьєв Дмитро Анатолійович

Зміст

Пам'яті Георгієвського Віктора Петровича (1937 – 2018) 7

До введення у дію Державної Фармакопеї України

Гризодуб О. І., Леонтьєв Д. А., Дмітрієва М. В., Воловик Н. В.
Перегляд загального тексту 5.3.N.1. *Статистичний аналіз результатів хімічного експерименту* для включення у Доповнення 2 Державної Фармакопеї України 2-го видання 9

5.3.N.1. Статистичний аналіз результатів хімічного експерименту[N] 16

Стандартизація лікарських засобів і валідація методик контролю якості

Бовтенко В. О., Безугла О. П., Столпер Ю. М, Ляпунов М. О.
Вивчення властивостей препаратів сальбутамолу сульфату в формі дозованих інгаляторів під тиском 57

Стадніченко О. В., Краснопольський Ю. М., Ярних Т. Г.
Валідація методики кількісного визначення іринотекану гідрохлориду у ліпосомальній формі методом ВЕРХ 71

Лікарська рослинна сировина

Грицик А. Р., Свірська С. П.
Дослідження умов зростання *Anchusa officinalis* L. та *Anchusa procera* Bess. у деяких регіонах України 77

Будова і властивості

Жук Ю. М., Васюк С. О., Антипенко Л. М.
Вивчення будови продукту взаємодії бісопрололу з тимоловим синім 82

Фармако-економічні та маркетингові дослідження

Півень О. П., Ткаченко І. В., Шуванова О. В.
Дослідження клієнтів аптечного закладу за компонентами лояльності 88

• Рецензенти: к. б. н., доцент Вовк О. Г.; д. фарм. н., професор Георгієвський В. П.; д. х. н., професор Гризодуб О. І.; д. фарм. н., професор Калинюк Т. Г.; д. х. н., ст.н.співр. Куліков А. Ю.; д. фарм. н., ст. наук. співроб. Леонтьєв Д. А.; д. фарм. н., доцент Сур С. В.; д. фарм. н., професор Шаповалова В. О.
• Випуск підготували: Саматов Р. С., Боярська В. О., Лук'янова І. С., Лук'янова О. С., Вовк О. Г.
• Рекомендовано до друку вченою радою ДП «Державний науковий центр лікарських засобів і медичної продукції», протокол № 1 від 6.02.2018.
• Підписано до друку 28.03.18. Тираж 500 прим.

Содержание

Памяти Георгиевского Виктора Петровича (1937 – 2018) 7

К введению в действие Государственной Фармакопеи Украины

Гризодуб А. И., Леонтьев Д. А., Дмитриева М. В., Воловик Н. В.
Пересмотр общего текста 5.3.N.1. *Статистический анализ результатов химического эксперимента* для включения в Дополнение 2 Государственной Фармакопеи Украины 2-го издания 9

5.3.N.1. Статистический анализ результатов химического эксперимента^{N} 16

Стандартизация лекарственных средств и валидация методик контроля качества

Бовтенко В. А., Безуглая Е. П., Столпер Ю. М, Ляпунов Н. А.
Изучение свойств препаратов сальбутамола сульфата в форме дозированных ингаляторов под давлением 57

Стадниченко А. В., Краснопольский Ю. М., Ярных Т. Г.
Валидация методики количественного определения иринотекана гидрохлорида в липосомальной форме методом ВЭЖХ 71

Лекарственное растительное сырье

Грицык А. Р., Свирская С. П.
Исследование условий произрастания *Anchusa officinalis* L. и *Anchusa procera* Bess. в некоторых регионах Украины 77

Строение и свойства

Жук Ю. Н., Васюк С. А., Антипенко Л. Н.
Изучение строения продукта взаимодействия бисопролола с тимоловым синим 82

Фармако-экономические и маркетинговые исследования

Пивень Е. П., Ткаченко И. В., Шуванова Е. В.
Исследование клиентов аптечного учреждения по компонентам лояльности 88

Пам'яті Георгієвського Віктора Петровича (1937-2018)

20 січня 2018 р. на 81-му році пішов з життя видатний український вчений, член-кореспондент НАН України, доктор фармацевтичних наук, професор, заслужений діяч науки та техніки України, кращий винахідник НАН України, головний науковий співробітник ДП «ДНЦЛЗ» та ДП «Фармакопейний центр», головний редактор журналу «Фармаком» Віктор Петрович Георгієвський.

Народився Віктор Петрович 23 червня 1937 р. у м. Артемівськ (зараз — Бахмут) Донецької обл. З 1954 р. по 1957 р. навчався на військово-фармацевтичному факультеті Харківського фармацевтичного інституту, після розформування якого продовжив навчання на фармацевтичному факультеті 1-го Московського медичного інституту ім. І. М. Сеченова, який закінчив у 1959 р.

Трудовий шлях Віктора Петровича був невід'ємно пов'язаний із Всесоюзним науково-дослідним інститутом хімії і технології лікарських засобів (ВНДІХТЛЗ) (з 1991 р. — Державне підприємство «Державний науковий центр лікарських засобів» (ДП «ДНЦЛЗ»)), де він працював з 1958 р. до останнього дня. З 1971 р. по 1989 р. учений очолював лабораторію та відділ вивчення якості ВНДІХТЛЗ. У 1989 р. колектив інституту обрав Віктора Петровича директором, і він очолював цю провідну наукову установу фармацевтичної галузі до 2008 р.

Георгієвський Віктор Петрович заснував школу стандартизації та контролю якості лікарських засобів, з якої вийшла ціла плеяда провідних фахівців з цього напряму в Україні. Під керівництвом Віктора Петровича в межах Програми з розробки генеричних препаратів ДП «ДНЦЛЗ» у 1992-2006 рр. розроблено та впроваджено 178 препаратів-генериків, а також 63 оригінальних препарати, що є конкурентоспроможними в Україні.

Але головним його дітищем є створене у 1992 р. Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів» (ДП «Фармакопейний центр»). Завдяки цій установі і передусім його засновнику в незалежній Україні була створена система контролю якості лікарських засобів і система їх реєстрації. Проте успішна діяльність будь-якої установи можлива лише за наявності професійного колективу. Команда спеціалістів, зібрана Віктором Петровичем, плідно працює і зараз.

Після створення ДП «Фармакопейний центр» Віктор Петрович ініціював розробку Державної Фармакопеї України, яка стала першою на пострадянському просторі. Створення цього нормативного документа вивело контроль якості лікарських засобів в Україні на світовий рівень.

На посаді директора ДП «ДНЦЛЗ» Віктор Петрович створив і очолив спеціалізовану вчену раду із захисту дисертацій на здобуття вчених ступенів кандидата і доктора фармацевтичних наук за спеціальністю «Стандартизація та організація виробництва лікарських засобів», через яку пройшло чимало спеціалістів сучасної фармацевтичної галузі України і країн СНД. Ще одним дітищем Віктора Петровича був науковий журнал «Фармаком», головним редактором якого він залишався до останнього дня.

По собі Віктор Петрович залишив значний науковий спадок: 535 наукових публікацій, 223 аналітичні нормативні документи на лікарські засоби, розроблені безпосередньо під його керівництвом. За його наукового керівництва захищені 12 докторських та 20 кандидатських дисертацій.

Заслуги Георгієвського Віктора Петровича були високо оцінені суспільством — йому присвоєні такі почесне звання, як «Заслужений діяч науки і техніки України» (1991 р.), «Кращий винахідник НАН України» (1999 р.), лау-

реат Всеукраїнського конкурсу «Ділова людина України» (2000 р., 2004 р.). Також Віктор Петрович був нагороджений орденами України «За заслуги» II та III ступенів, медалями та почесними грамотами. У 2006 р. Георгієвський В. П. був обраний депутатом Харківської міської ради V скликання.

Видатний організаторський і професійний талант Віктора Петровича поєднувався з безцінними людськими якостями, життєвою мудрістю, якою він щедро ділився з колегами й учнями. Віктор Петрович пішов з життя раптово. Він ніколи не втрачав оптимізму і був дуже життєлюбною людиною, незважаючи на свій поважний вік, мав далекоглядні та цікаві плани щодо не лише розвитку наукових напрямів своєї діяльності, але й особистого життя. Для всіх, хто був з ним знайомий, Віктор Петрович завжди був та залишиться яскравим прикладом багатогранної особистості, адже він активно цікавився та мав значні досягнення у таких сферах, як мисливство, риболовля, садівництво, кулінарія, література, подорожі та багато іншого. Усі, хто спілкувався з Віктором Петровичем, запам'ятають його насамперед як людину широких поглядів, з якою можна було обговорити найрізноманітніші теми та почерпнути для себе багато нового й корисного.

Ця втрата є непоправною. Колектив ДП «Фармакопейний центр», ДП «ДНЦЛЗ», редакція журналу «Фармаком» та колеги глибоко співчувають рідним, близьким та друзям Віктора Петровича; ми назавжди збережемо у своїх серцях пам'ять про нього.

До введення у дію Державної Фармакопеї України

УДК 615.07

Гризодуб А. И., Леонтьев Д. А., Дмитриева М. В., Воловик Н. В.
Государственное предприятие «Украинский научный фармакопейный центр качества лекарственных средств»

Пересмотр общего текста 5.3.N.1. *Статистический анализ результатов химического эксперимента* для включения в Дополнение 2 Государственной Фармакопеи Украины 2-го издания

Показана целесообразность пересмотра общего текста 5.3.N.1. *Статистический анализ результатов химического эксперимента* (далее — общий текст) Государственной Фармакопеи Украины (ГФУ). Обсуждены специфические для фармацевтического сектора принципы стандартизации, определяющие применение статистики и метрологии для контроля качества лекарственных средств. Обсуждена реализация концепции неопределенности результатов измерений для контроля качества лекарственных средств. Приведены рекомендации при идентификации выпадающих вариант. Сформулированы «подтверждающий» и «контролирующий» подходы для количественного определения субстанций и готовых лекарственных средств. Описаны подходы к оценке систематической составляющей неопределенности как статистически незначимой и практически незначимой. Введены рекомендации к верификации мерной посуды. Описан принцип установления требований к RSD параллельных хроматограмм при количественном определении для готовых лекарственных средств. Описаны подходы к установлению гарантирующих допусков содержания исходя из фармакопейных правил стандартизации, с учетом влияния неоднородности между единицами дозированных лекарственных средств. Рассмотрены подходы к оценке результатов тестирования (внутрилабораторного и межлабораторного) лабораторий контроля качества лекарственных средств. Разработан новый проект общего текста для включения в Дополнение 2 ГФУ 2-го издания.

Ключевые слова: общий текст 5.3.N.1, Государственная Фармакопея Украины, статистический анализ результатов химического эксперимента, стандартизация качества лекарственных средств, применение концепции неопределенности.

Развитие стандартизации в фармацевтическом секторе требует применения научно обоснованных подходов и критериев для заключения о качестве лекарственного средства (принятия решения о соответствии спецификациям). Оценить риск принятия некорректного решения позволяет концепция неопределенности результатов измерений. Однако конкретная реализация данной концепции должна опираться на систему стандартизации, принятую в данной отрасли.

Государственная Фармакопея Украины (ГФУ) использует метрологическую систему, опирающуюся на концепцию неопределенности, которая введена в общие тексты ГФУ 5.3.N.1. *Статистический анализ результатов химического эксперимента* (далее — общий текст) [1], 5.3.N.2. *Валидация аналитических методик и испытаний* [1], 5.12.N. *Стандартные образцы* [2] и общие статьи ГФУ 2.2.25.N. *Абсорбционная спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях* [1], 2.2.46. *Методы хроматографического разделения* [1].

В период с момента опубликования общего текста в ГФУ 1-го издания, его переиздания в Дополнении 1 к ГФУ 1-го издания и в ГФУ 2-го издания были разработаны метрологические концепции, которые носят достаточно общий характер (применение «подтверждающего» и «доказывающего» подходов, понятия «статистически значимое различие» и «практически значимое различие» и др.). Кроме того, был накоплен существенный опыт в практическом применении статистики и решении специфических проблем при метрологическом обеспечении конкретных фармацевтических процедур (аттестация вторичных стандартных образцов для количественного определения субстанций и готовых лекарственных средств (ГЛС), проведение внешнего тестирования лабораторий контроля качества лекарственных средств и др.). Все это потребовало пересмотра и существенного дополнения действующего общего текста.

Целью данной статьи является обсуждение специфики применения статистики и метрологии для обеспечения качества лекарственных средств, которая отражена в общем тексте ГФУ 5.3.N.1, и краткое обсуждение изменений в предлагаемой редакции текста.

Обсуждение

Пересмотренный общий текст 5.3.N.1. *Статистический анализ результатов химического эксперимента*^{N} предлагается для введения в Дополнение 2 ГФУ 2-го издания.

Цель данного общего текста — метрологическое сопровождение всех лабораторных

«практик», связанных с качеством лекарственных средств (ЛС). Задача — предоставить методологическую помощь в использовании научно обоснованных критериев и корректных статистических приемов для конкретных задач обеспечения качества ЛС исходя из принятых в фармацевтическом секторе принципов стандартизации. Таким образом, данный общий текст формирует в целом статистику именно фармацевтического анализа.

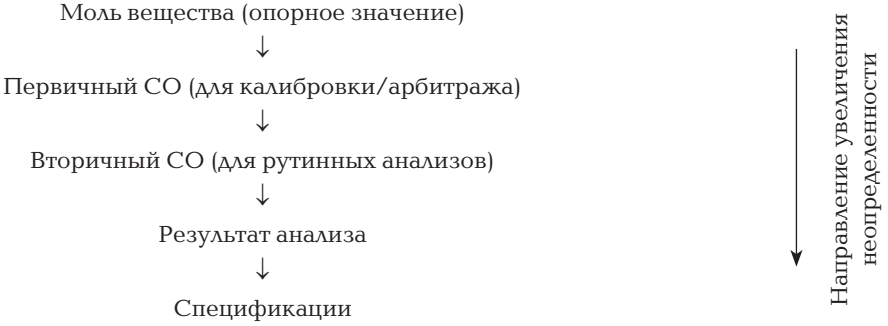
Совместно с общим текстом 5.3.N.2. *Валидация аналитических методик и испытаний*, национальным дополнением к общему тексту 5.12. *Стандартные образцы* и национальными дополнениями к монографиям на физико-химические методы анализа 2.2.25. *Абсорбционная спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях* и 2.2.46. *Методы хроматографического разделения* данный общий текст представляет взаимосогласованную метрологическую базу.

Специфика применения статистики и метрологии в фармацевтическом секторе определяется принятыми принципами стандартизации, в первую очередь фармакопейными, создающими базу для стандартизации, на которую опираются все другие регуляторные органы — при регистрации ЛС, при инспектировании производства, при контроле качества ЛС на рынке страны. Данные принципы стандартизации гармонизированы на международном уровне и создают основу для международного обращения лекарственных средств. Поэтому метрологические концепции должны разрабатываться и применяться только в гармонизации с принципами стандартизации в фармацевтическом секторе.

Описываемая в общем тексте статистика опирается на концепцию неопределенности результатов измерений как на современную научную базу обеспечения качества результатов измерений. Концепция неопределенности принципиально эквивалентна традиционной концепции метрологических погрешностей, однако первая рассматривает цепочку калибровок (Рис. 1), отталкиваясь от спецификаций, а последняя — от опорного значения. Концепция неопределенности рассматривает все источники варьирования, связанные с аналитической системой и с объектом анализа, в привязке к спецификациям, поэтому она изначально работает на конечный результат — как обеспечить принятие метрологически надежного заключения о качестве. Заключение о качестве, то есть о соответствии результата анализа требованиям спецификаций, является одним из ключевых моментов практического применения метрологии, из которого следуют очень многие другие принципы применения статистики. Отметим, что в силу протяженности цепочки калибровок при использовании концепции погрешностей постоянно возникали казусы. Например, допустимое по методике варьирование от операции взвешивания могло превышать ширину допусков содержания [3]. Концепция неопределенности позволяет легко выявлять такие несоответствия.

Таким фундаментальным правилом с точки зрения корректного применения концепции неопределенности является «Фармакопейное правило принятия решения о соответствии спецификациям», которое описано в общих замечаниях в Европейской Фармакопее [4] и звучит следующим образом: «Допустимые пределы основаны на данных, полученных в условиях обычной аналитической практики, с учетом типичного варьирования результатов, допустимого варьирования при производстве и допустимого разложения (нестабильность). При принятии решения о соответствии качества анализируемого ЛС требованиям монографии не должны использоваться какие-либо дополнительные доверительные интервалы». Аналогичные разъяснения также приведены в Фармакопее США [5] и Международной фармакопее ВОЗ [6].

Рисунок 1



Типичная цепочка калибровок, характерная для химических анализов в фармацевтическом секторе

Можно видеть, что в фармацевтическом секторе любое отклонение от спецификаций трактуется в пользу потребителя/пациента. И это совершенно логично, потому что риск производителя уже фактически учтен в спецификациях. Отметим, что в нефармацевтическом секторе рассматриваются как различные варианты конструирования спецификаций, так и различные варианты учета риска производителя и потребителя. Данное фармакопейное правило сразу же отсекает другие варианты принятия решения.

Отметим, что в «Фармакопейном правиле принятия решения о соответствии спецификациям» фигурирует «принятое варьирование» для результатов анализа. В контроле качества ЛС имеются два независимых участника: производитель и контролер (лаборатория, контролирующая качество ЛС, находящихся в обращении на рынке страны) — и, соответственно, две участвующие лаборатории. Фактическое варьирование в различных лабораториях может очень сильно отличаться. Для того чтобы иметь инструмент решения конфликтных ситуаций для случая, когда две лаборатории сделали противоположные заключения о соответствии спецификациям, необходимо определить, что же является «принятым варьированием».

Отметим чрезвычайно важное следствие. Поскольку фармакопеи вводят понятие «типичное аналитическое варьирование», это означает, что заключение о соответствии спецификациям, сделанное лабораторией, остается легитимным, если аналитическое варьирование не превышает «принятой» величины. Если при повторном анализе другая лаборатория получила результат анализа с гораздо меньшей неопределенностью и при этом сделала противоположное заключение о качестве ЛС, то ее результат по качеству не «лучше» результата первой лаборатории, для которого варьирование находится просто в рамках «принятого». Соответственно, такой повторный результат не может «перечеркнуть» исходный. Данный вывод совершенно очевиден, исходя из логики конструирования допусков содержания — аналитическое варьирование уже включено в спецификации.

Другое совершенно очевидное следствие — необходимость для производителей устанавливать гарантирующие допуски содержания, которые применяются при выпуске ЛС и устанавливают более жесткие требования, чем при контроле качества данного ЛС при его обращении. Гарантирующие допуски учитывают риск, что результат анализа может лежать слишком близко к допуску содержания и приводить к выбраковке ЛС при его последующем анализе в другой лаборатории.

Отметим, что поскольку в оценку соответствия ЛС спецификациям может быть вовлечено две лаборатории, представляющие разные «стороны» — производителя и контролера, то единственным способом урегулировать конфликтную ситуацию, когда лаборатории принимают противоположные заключения о соответствии спецификациям, является нормирование предельных величин варьирования. Это относится и к суммарному варьированию результатов анализа, и к его компонентам.

Отметим, что политикой фармакопей является стандартизация варьирования для общепринятых аналитических операций. Например, фармакопея предписывает использовать для количественного определения (КО) только посуду класса А по стандарту ISO, нормирует RSD для сходимости параллельных хроматограмм и т. д. В идеале это должно приводить к тому, что суммарное варьирование результатов анализа не превышает некой величины, которая разумно согласуется с шириной спецификаций для КО. Однако именно внедрение концепции неопределенности позволило выявить многочисленные нестыковки в требованиях к различным компонентам аналитической системы по отношению к спецификациям [7–9]. Это потребовало дополнительной стандартизации — например, введения в общую статью 2.2.25 (национальная часть) указания, что в рутинном анализе используют не менее трех параллельных измерений и нормирование максимально допустимого значения RSD с выниманием кюветы при квалификации оборудования.

Исходя из фармакопейной концепции оценки фактического значения неопределенности результатов для конкретной лаборатории, примерами которых переполнены научные публикации, являются бессмысленными с точки зрения необходимости выполнения анализа одного и того же ЛС в другой лаборатории. Важной является оценка неопределенности, которая может быть получена в другой лаборатории, при условии, что реальные значения неопределенности равны максимально допустимым. Например, в лаборатории производителя ЛС при валидации методики может использоваться мерная посуда с характеристиками существенно более высокими, чем требования к мерной посуде класса А по стандарту ISO, сходимость инжекций может быть гораздо лучше, чем указано в тесте «Проверка пригодности хроматографической системы» и т. д. Однако при контроле ЛС при

его обращении на рынке контрольная лаборатория имеет право соответствовать минимальным требованиям. И если в одной лаборатории сделано заключение о пригодности методики только на основании экспериментальных результатов (без учета максимально допустимых значений), то оно фактически относится только к данной лаборатории и, более того, только к данному состоянию измерительных приборов и других компонентов аналитической системы. Поэтому была разработана процедура прогноза неопределенности, которая позволяет оценить максимально допустимую неопределенность для данной методики анализа исходя из «наихудшего допустимого случая» — из предельных значений для частных составляющих неопределенности компонентов аналитической системы, которые стандартизованы фармакопейными требованиями. Для реализации данного подхода потребовалось разработать требования к максимально допустимому варьированию для значимых источников варьирования, которые всегда присутствуют и поэтому нуждаются в стандартизации: для операций пробоподготовки (взвешивание и использование мерной посуды в рутинном анализе) и для конечной аналитической операции (требования к пригодности аналитической системы во время выполнения анализа или требования к квалификации оборудования).

Важнейшим специфическим моментом фармацевтического сектора является то, что допуски содержания для КО заданы заранее. В соответствии с документом Европейского агентства по лекарственным средствам (EMA) 3AQ11a «Спецификации и контрольные испытания готовой продукции» [10], для ГЛС отклонения от номинального содержания активной(ых) субстанции(й) при выпуске не должны превышать ± 5 %, если не обосновано иначе. Еще жестче ситуация с фармакопейными тестами «Растворение» и «Однородность дозированных единиц ЛС» (которые можно рассматривать как специфический случай КО), для которых используются однозначно заданный дизайн эксперимента и правило принятия решения, которые, в отличие от спецификаций для КО, вообще не могут быть изменены.

Поскольку спецификации заданы заранее, это потенциально позволяет выработать единообразные требования к методикам анализа исходя из вида фармацевтического испытания, а для КО — с учетом ширины допусков содержания. В применении концепции неопределенности это должны быть требования к максимально допустимой неопределенности результатов анализа ($max\Delta_{As}$) и, по мере необходимости, требования к компонентам аналитической системы (например, обоснованные исходя из применения для анализа ЛС требования к квалификации лабораторного оборудования, требования к валидационным критериям и т. д.). Именно в данном направлении и развивается описываемое применение статистики в данном общем тексте.

Далее приводятся комментарии к изменениям в пересмотренном общем тексте.

Общие замечания к идентификации выпадающих вариант. В данном пункте приведены комментарии по поводу проблем корректного использования статистики исходя из практического опыта ее применения для фармацевтического анализа. В частности, описанные проблемы применения статистики к малым выборкам отражают опыт аттестации рабочих стандартных образцов (РСО), а проблемы применения к большим выборкам — оценку результатов межлабораторного тестирования.

Метрологические характеристики методики анализа. Данный пункт существенно расширен. В него внесены принципиальные положения, отражающие специфику фармацевтического анализа.

Прежде всего, сформулировано различие в назначении контроля качества ЛС — соответствие спецификациям и оценка истинного значения содержания (традиционная задача химического анализа). Такое разграничение является следствием специфики конструирования спецификаций для ЛС: максимально допустимая неопределенность результата анализа ($max\Delta_{As}$) уже включена в спецификации. Поэтому допуск содержания, указанный в спецификациях, не является фактическим значением содержания аналита в испытуемом образце, что может встречаться в спецификациях в нефармацевтическом секторе. Предельно допустимое значение, указываемое в спецификациях, есть значение содержания, установленное из соображений безопасности и эффективности ЛС, плюс $max\Delta_{As}$ (выраженной в виде интервала, как «расширенная» неопределенность). Это справедливо для абсолютно всех спецификаций на ЛС, и может вводить в заблуждение аналитиков, которые ориентируются на подходы химического анализа и ставят задачей именно оценку истинного содержания. Исходя из этого, целью контроля качества ЛС является установление, соответствует или нет полученный результат анализа спецификациям с заданной надежностью безотносительно установления фактического содержания аналита. Условие корректного применения данного подхода —

фактическая неопределенность результатов анализа не должна превышать максимально допустимую. Хотя постановка задачи — оценка истинного значения содержания — также характерна для фармацевтического анализа. Использование данных различных подходов приводит к существенно разным требованиям к метрологическим характеристикам методик анализа.

Развитием данной концепции является формулирование «подтверждающего» и «доказывающего» подходов, описанных в общем тексте. Их применение имеет непосредственное отношение к специфике КО для субстанций и ГЛС. Вместе с тем данные подходы являются достаточно универсальными исходя из методологии фармакопей и GMP.

В общий текст также вводится понятие статистически значимого различия систематической составляющей погрешности и практически значимого отличия. Их совместное применение формирует двухуровневый критерий приемлемости, который широко используется, в частности при проведении валидации аналитических методик.

Вышеописанный подход опирается на принцип незначимости, сформулированный для интервалов, а не для стандартных отклонений. Отметим, что количественная регламентация в спецификациях ЛС выражена именно в диапазонах значений, а не в стандартных отклонениях, и таким образом заявленный принцип незначимости позволяет увязывать метрологические требования к методике анализа со спецификациями, т. е. делать научно обоснованное заключение о соответствии методики своему назначению. Данный принцип может успешно использоваться также на других звеньях цепочки калибровок, характерной для фармацевтического анализа: при валидации аналитических методик, при квалификации оборудования, аттестации стандартных образцов, оценивании результатов внутри- или межлабораторного тестирования и др.

Отметим, что использование принципа незначимости является частным случаем нахождения «бюджета» неопределенности (что является конечной целью применения концепции неопределенности — оценить варьирование для конечного результата анализа). Использование данного принципа имеет особенное значение для фармацевтического сектора. Применение концепции неопределенности предполагает, что известны оценки неопределенностей для всех частных составляющих суммарной неопределенности. Традиционно фармакопеи не указывают значение неопределенности аттестованной характеристики (Δ_{RS}) для фармакопейных стандартных образцов (ФСО). Формально при использовании таких ФСО концепция неопределенности не может быть реализована. Однако фармакопеи заявляют, что Δ_{RS} для ФСО является незначимой для конкретного применения, указанного в фармакопее. Использование принципа незначимости фактически делает возможным применение концепции неопределенности в фармацевтическом секторе. Точно так же применение принципа незначимости делает возможным аттестацию РСО для количественных фармацевтических испытаний (см. 5.12^{N}) и помогает решить множество других прикладных задач фармацевтического анализа.

Интерпретация результатов анализа. Методика анализа для КО разрабатывается таким образом, чтобы обеспечивать метрологически корректное принятие решения о соответствии заранее заданным спецификациям. Важно, что фактическая неопределенность методики не должна превышать максимально допустимое значение ($max\Delta_{As}$) при выполнении анализа в любой лаборатории, аккредитованной на контроль качества ЛС. Для этого достаточно, чтобы лаборатория выполняла фармакопейные рекомендации и другие общие рекомендации к лабораторным практикам.

Это принципиально отличает такие методики от используемых в нефармацевтическом секторе («метрологически аттестованная методика»), для которых устанавливается фактическое значение неопределенности, которое должно затем соблюдаться в данной лаборатории. При этом остается много неясностей с применением данного подхода для контроля качества ЛС: например, возможно ли достижение таких метрологических характеристик в другой лаборатории.

В данный пункт включены рекомендации к метрологическому обеспечению важнейших лабораторных практик. Для верификации мерной посуды введена, исходя из принципа незначимости, оценка качества результатов верификации.

Приведено также метрологическое обоснование для установления требований к максимально допустимому значению RSD для проверки пригодности хроматографической системы в КО для ГЛС, в соответствии с принятой концепцией ГФУ [11].

Гарантия качества продукции. Данный пункт дополнен рассмотрением специфики конструирования гарантирующих допусков содержания для КО в дозированных ЛС. Описанный подход учитывает, что для дозированных ЛС основным источником варьирования может быть техно-

логическая причина, а именно неоднородность между единицами дозированного ЛС.

Отметим, что данный подход демонстрирует для допусков содержания ± 5 % очень хорошую согласованность фармакопейных требований к:

— максимально допустимой неопределенности результатов анализа maxΔ_{As};
— максимально допустимому варьированию между единицами дозированного ЛС (монография 2.9.40);
— фармакопейной стратегии усреднения (использование для проведения КО усредненной пробы из 20 единиц дозированного ЛС).

В данный пункт общего текста также включено новое направление использования статистики, которое не рассматривалось в предыдущих редакциях — оценка результатов как внутрилабораторного тестирования, так и внешнего независимого оценивания лабораторий, а также межлабораторного эксперимента.

Делается акцент на подходе, когда требования к оценке результатов устанавливаются исходя из правил стандартизации в фармацевтическом секторе, т.е. исходя из назначения методики/испытания.

Текст дополнен практическими примерами для каждого пункта, что является очень ценным для пользователей.

Из данной редакции общего текста исключен пункт «Последовательная схема статистического анализа результатов химических измерений», как не отражающий специфику принятия решения о соответствии спецификациям в фармацевтическом секторе. Исключенный подход основан на том, что при увеличении числа анализов возможно с заданной надежностью обеспечить принятие решения, находится или нет истинное значение для аналита в пределах спецификаций. Как обсуждалось ранее, данный подход противоречит принципу конструирования спецификаций для лекарственных средств (максимально допустимое аналитическое варьирование включено в спецификации) и фармакопейному правилу принятия решения (заключение о соответствии спецификациям принимается без дальнейшего использования каких-либо интервалов).

Выводы

1. Обсуждены специфические для фармацевтического сектора принципы стандартизации, которые определяют применение статистики и метрологии для контроля качества лекарственных средств.

2. Обсуждена реализация концепции неопределенности результатов измерений для контроля качества лекарственных средств.

3. Исходя из применения правил стандартизации фармацевтического сектора обсуждено наполнение общего текста 5.3.N.1, а также предлагаемые дополнения и изменения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Державна Фармакопея України: в 3 т. / Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». — 2-е вид. — Харків: Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2015. — Т. 1. — 1128 с.
2. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». — 2-е вид. — Доповнення 1. — Харків: Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2016. — 360 с.
3. Гризодуб А.И. Метрологические аспекты официальных методик контроля качества лекарственных средств. 1. Методики ВЭЖХ / Гризодуб А.И., Леонтьев Д.А., Левин М.Г. // Фізіологічно активні речовини. — 2001. — № 1 (31). — С. 32-44.
4. European Pharmacopoeia. 9th Edition. — European Directorate for the Quality of Medicines (EDQM). — Council of Europe, 67075 Strasbourg Cedex, France 2016. — 4016 p.
5. USP 41 — NF 36 — The United States Pharmacopeia and National Formulary 2018. — United States Pharmacopoeial Convention Inc., USA, November 2017. — 8200 p.
6. The International Pharmacopoeia. 7th Edition, 2017 [Electronic resource]. — Access mode: http://apps.who.int/phint/en/p/docf/ (date of the application: 07.02.2018).
7. Квалификация лабораторного оборудования — метрологическая концепция. Сообщение 2. Реализация метрологической концепции для спектрофотометров УФ- и видимой областей спектра / Леонтьев Д.А., Гризодуб А.И., Зинченко А.А. [и др.] // Фармацевтическая отрасль. — 2013. — № 5 (40), октябрь. — С. 106-110.
8. Стандартизованная процедура валидации количественных методик титрования лекарственных средств / А.И. Гризодуб, Д.А. Леонтьев, С.О. Чикалова, А.Г. Верушкин // Фармаком. — 2009. — № 2. — С. 5-29.
9. Леонтьев Д.А. Метрологический контроль результатов анализа: специфика применения концепции неопределенности в фармацевтическом анализе / Д.А. Леонтьев, А.И. Гризодуб // Разработка и регистрация лекарственных средств. — 2013. — № 4 (5). — С. 68-75.
10. Specifications and Control Tests on the Finished Product: ICH Topic 3AQ11a / The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use — London: EMEA, 1991. — P. 83-94.
11. Гризодуб А.И. Стандартизованные процедуры валидации методик контроля качества лекарственных средств. — Харьков: Государственное предприятие «Украинский научный фармакопейный центр качества лекарственных средств», 2016. — 396 с.

УДК 615.07

Резюме

Гризодуб О. І., Леонтьєв Д. А.,
Дмітрієва М. В., Воловик Н. В.
Дегржавне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів»

Перегляд загального тексту 5.3.N.1. *Статистичний аналіз результатів хімічного експерименту* для включення у Доповнення 2 Державної Фармакопеї України 2-го видання

Показано доцільність перегляду загального тексту 5.3.N.1. *Статистичний аналіз результатів хімічного експерименту* (далі — загальний текст) Державної Фармакопеї України (ДФУ). Обговорено специфічні для фармацевтичного сектора принципи стандартизації, які визначають застосування

статистики та метрології для контролю якості лікарських засобів. Обговорено реалізацію концепції невизначеності результатів вимірювань для контролю якості лікарських засобів. Наведено рекомендації під час ідентифікації варіант, що випадають. Сформульовано «підтверджуючий» і «контролюючий» підходи для кількісного визначення субстанцій і готових лікарських засобів. Описано підходи до оцінки систематичної складової невизначеності як статистично незначущої і практично незначущої. Уведено рекомендації до верифікації мірного посуду. Описано принцип встановлення вимог до RSD паралельних хроматограм під час кількісного визначення для готових лікарських засобів. Описано підходи до встановлення гарантуючих допусків вмісту виходячи з фармакопейних правил стандартизації, з урахуванням впливу неоднорідності між одиницями дозованих лікарських засобів. Розглянуто підходи до оцінки результатів тестування (внутрішньолабораторного і міжлабораторного) лабораторій контролю якості лікарських засобів. Розроблено новий проект загального тексту для включення в Додаток 2 ДФУ 2-го видання.

Ключові слова: загальний текст 5.3.N.1, Державна Фармакопея України, статистичний аналіз результатів хімічного експерименту, стандартизація якості лікарських засобів, застосування концепції невизначеності.

UDC 615.07

Summary

Gryzodub O. I., Leontiev D. A.,
Dmitrieva M. V., Volovyk N. V.
State Enterprise «Ukrainian Scientific Pharmacopoeial Center for Quality of Medicines»

The revision of the General Text 5.3.N.1. *Statistical analysis of the results of chemical experiment* to be included in Supplement 2 to the 2[d] Edition of the State Pharmacopoeia of Ukraine

The rationale for revising the General Text 5.3.N.1 *Statistical analysis of the results of chemical experiment* (hereinafter — General Text) of the State Pharmacopoeia of Ukraine (SPhU) is provided. Principles of standardisation specific for the pharmaceutical sector defining the use of statistics and metrology for quality control of medicines and the implementation of the uncertainty concept of measurement results for quality control of medicinal products introduced in the SPhU are discussed. The content of the General Text is proposed considering the standardisation principles adopted in the pharmaceutical sector. Practical recommendations for the treatment of outlying results are given. The «confirming» and «controlling» approaches and the specificity of their application for the assay of substances and medicinal products have been formulated. Approaches to the evaluation of the systematic constituent of uncertainty as statistically insignificant and practically insignificant are described. Recommendations for the verification of volumetric apparatus are provided based on the insignificance of the uncertainty of results in relation to the specifications. The principle of establishing requirements for RSD of the analytical signal in series of injections of the reference solution for the assay of medicinal products is discussed. Approaches to the establishment of guaranteeing content limits are offered reasoning from the pharmacopoeial principles of standardisation and taking into account the effect of inhomogeneity between units of dosage forms. Approaches to the evaluation of the laboratory and interlaboratory test results of the quality control laboratories for medicines are reviewed. The item «The sequential scheme for the statistical analysis of the results of chemical measurements» was excluded as not reflecting the specifics of the decision-making about compliance with specifications in the pharmaceutical sector. A new draft of the General Text to be included in Supplement 2 to the 2[d] Edition of the State Pharmacopoeia of Ukraine was developed.

Keywords: General Text 5.3.N.1, State Pharmacopoeia of Ukraine, statistical analysis of the results of chemical experiment, standardisation of the quality of medicines, application of the concept of uncertainty.

Гризодуб Александр Иванович. Окончил Харьковский государственный университет (1971). Д. х. н. (1990), профессор. (1996). Главный научный сотрудник, директор ГП «Украинский научный фармакопейный центр качества лекарственных средств».

Леонтьев Дмитрий Анатольевич. Окончил Харьковский государственный университет (1986). Д. фарм. н. (2016), ст. науч. сотр. (2002). Начальник отдела валидации и стандартных образцов, заместитель директора по научной работе ГП «Украинский научный фармакопейный центр качества лекарственных средств».

Дмитриева Марина Васильевна. Окончила Харьковский государственный университет. К. фарм. н. (2009), ст. науч. сотр. (2016). Ученый секретарь, заведующая сектором Программы профессионального тестированияПТ ГП «Украинский научный фармакопейный центр качества лекарственных средств».

Воловик Наталья Валерьевна. Окончила Харьковский государственный университет. К. фарм. н. (2008). Заместитель начальника отдела валидации и стандартных образцов ГП «Украинский научный фармакопейный центр качества лекарственных средств».

5.3.N.1. СТАТИСТИЧНИЙ АНАЛІЗ РЕЗУЛЬТАТІВ ХІМІЧНОГО ЕКСПЕРИМЕНТУ^N

ЗМІСТ

1. ВИБІРКА

1.1. Середнє значення та стандартне відхилення

1.2. Перевірка однорідності вибірки. Виключення значень варіант, що випадають

1.2.1. Вибірки, малі за обсягом

1.2.2. Вибірки, великі за обсягом

1.2.3. Загальні зауваження щодо ідентифікації варіант, що випадають

1.3. Об'єднання вибірок

1.3.1. Об'єднана дисперсія й об'єднане середнє

1.3.2. Критерій Бартлета

1.3.3. Критерій Кокрена

1.4. Довірчі інтервали й оцінка їх величини

1.5. Однобічні та двобічні довірчі інтервали

2. МЕТРОЛОГІЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ МЕТОДИКИ АНАЛІЗУ

2.1. Представлення метрологічних характеристик

2.2. Формулювання аналітичної задачі

2.3. Особливості контролю якості лікарських засобів за показником «Кількісне визначення»

2.3.1. Загальні положення

2.3.2. Доказовий підхід

2.3.3. Підтверджуючий підхід

2.4. Оцінка значущості систематичної похибки

2.4.1. Статистична значущість систематичної похибки

2.4.2. Практична значущість систематичної похибки

2.4.2.1. Принцип незначущості

2.4.2.2. Критерій практичної незначущості систематичної похибки

3. ПОРІВНЯННЯ ДВОХ МЕТОДИК АНАЛІЗУ ЗА ВІДТВОРЮВАНІСТЮ

4. МЕТРОЛОГІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА СЕРЕДНЬОГО РЕЗУЛЬТАТУ

5. ПОРІВНЯННЯ СЕРЕДНІХ РЕЗУЛЬТАТІВ ДВОХ ВИБІРОК

5.1. Розходження дисперсій s_1^2 і s_2^2 статистично невірогідно

5.2. Розходження дисперсій s_1^2 і s_2^2 статистично вірогідно

5.3. Відоме точне значення величини A

5.4. Використання довірчих інтервалів

6. ІНТЕРПРЕТАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ АНАЛІЗУ

6.1. Оцінка збіжності результатів паралельних випробувань

6.2. Забезпечення якості результатів

6.2.1. Кваліфікація мірного посуду

6.2.2. Придатність хроматографічної системи

6.3. Гарантія якості продукції

6.3.1. Метрологічно атестована методика

6.3.2. Валідована методика

6.3.3. Урахування факторів неоднорідності для дозованих одиниць

6.4. Оцінка результатів тестування

6.4.1. Розрахунок метрологічних характеристик міжлабораторної вибірки

6.4.2. Оцінка якості результатів учасників тестування

6.4.3. Внутрішньолабораторне тестування

6.4.4. Зовнішнє тестування

6.4.4.1. Використання метрологічних характеристик результатів вибірки учасників

6.4.4.2. Використання максимально допустимої не-

визначеності методики аналізу

6.4.4.2.1. Наявність загальної систематичної похибки результатів учасників

6.4.4.2.2. Загальна характеристика якості результатів учасників

7. РОЗРАХУНОК І СТАТИСТИЧНА ОЦІНКА ПАРАМЕТРІВ ЛІНІЙНОЇ ЗАЛЕЖНОСТІ

8. ПРИКЛАДИ

8.1. Обчислення середнього значення та дисперсії

8.2. Перевірка однорідності вибірки малого обсягу

8.3. Обчислення довірчих інтервалів і невизначеностей вимірювань

8.4. Перевірка гіпотези рівності дисперсій

8.4. 1. Об'єднання результатів вибірок, різних за обсягом

8.4.2. Об'єднання результатів вибірок, однакових за обсягом

8.5. Порівняння двох методик аналізу за прецизійністю і правильністю результатів. Статистична і практична значущість систематичної похибки

8.5.1. Збіжність та наявність статистично значущої систематичної похибки

8.5.2. Наявність практично значущої систематичної похибки

8.6. Порівняння середніх результатів двох вибірок

8.6.1. Використання дисперсій

8.6.2. Використання максимально допустимої невизначеності

8.7. Забезпечення якості результатів

8.7.1. Кваліфікація градуйованої піпетки місткістю 5 мл

8.8. Гарантуючі допуски

8.8.1. Метрологічно атестована методика

8.8.2. Валідована методика

8.8.3. Урахування факторів неоднорідності для дозованих одиниць

8.8.4. Граничні допуски вмісту за специфікацією для дозованих одиниць

8.9. Оцінка результатів тестування

8.9.1. Внутрішньолабораторне тестування персоналу за результатами верифікації градуйованої піпетки місткістю 5 мл

8.9.2. Зовнішнє тестування: визначення вмісту домішки В лінкоміцину в субстанції лінкоміцину методом ВЕРХ

9. РОЗРАХУНОК НЕВИЗНАЧЕНОСТІ ФУНКЦІЇ ДЕКІЛЬКОХ ВИПАДКОВИХ ЗМІННИХ

9.1. Лінійна модель

9.1.1. Зважене середнє

9.2. Підхід Уелча — Сатертуейта

9.3. Приклади розрахунків невизначеності функції декількох змінних

9.3.1. Розрахунок невизначеності аналізу готового лікарського засобу за допомогою високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ)

9.3.2. Прогноз невизначеності спектрофотометричного аналізу готового лікарського засобу

9.3.3. Розрахунок середнього значення декількох нерівноточних вибірок

10. ДОДАТОК

Таблиця 10.1. *Числові значення контрольного критерію* $Q(P, n)$

Таблиця 10.2. *Числові значення критерію Стьюдента* $t(p, v)$

Таблиця 10.3. *Відсоткові точки розподілу* $\chi^2(P_1, v)$

Таблиця 10.4. *Критерій Кокрена*

Таблиця 10.5. *Відсоткові точки розподілу Фішера* ($F(P_1, \nu_1, \nu_2)$ *— розподіл)*

Таблиця 10.6. *Відсоткові точки вибіркового коефіцієнта кореляції r*

ПРИЙНЯТІ ПОЗНАЧЕННЯ

У цій статті для переважного використання прийняті такі позначення:

A	вимірювана величина;
a	вільний член лінійної залежності;
b	кутовий коефіцієнт лінійної залежності;
F	критерій Фішера;
$f(x, \mu, \sigma)$	функція щільності ймовірності нормального розподілу;
H_0	нульова гіпотеза;
H_1	альтернативна гіпотеза;
i	порядковий номер варіанти;
L	фактор, використовуваний при оцінці збіжності результатів рівнобіжних визначень;
m, n	об'єми вибірки;
p	ймовірність;
P	довірча ймовірність без конкретизації постановки завдання, у відсотках;
P_2, P_1	довірча ймовірність відповідно при дво- й однобічному завданні, у відсотках;
Q_1, Q_n	контрольні критерії для ідентифікації грубих похибок;
R	розмах варіювання;
R_c	загальний індекс кореляції;
r	(лінійний) коефіцієнт кореляції;
$RSD = s_r \times 100\ \%$	відносне стандартне відхилення, у відсотках;
$RSD_{\overline{x}} = s_{\overline{x},r} \times 100\ \%$	відносне стандартне відхилення середнього результату, у відсотках;
RSD_p	об'єднане відносне стандартне відхилення, у відсотках;
s	стандартне відхилення;
s_r	відносне (щодо середнього результату) стандартне відхилення;
s^2	дисперсія;
s_r^2	відносна дисперсія;
$s_{\overline{x}}$	стандартне відхилення середнього результату;
$s_{\overline{x},r}$	відносне (щодо середнього результату) стандартне відхилення середнього результату;
s_{lg}	логарифмічне стандартне відхилення;
$s_{\lg}^2$	логарифмічна дисперсія;
$s_{\lg \overline{x}}$	логарифмічне стандартне відхилення середнього результату;
s_p	об'єднане стандартне відхилення;
s_0^2, s_b^2, s_a^2	загальна дисперсія та дисперсія коефіцієнтів лінійної залежності;
t	критерій Стьюдента;
x, y	поточні координати в рівнянні лінійної залежності;
X_i, Y_i	значення змінних x та y, обчислені з рівняння лінійної залежності;
$\overline{x}$, $\overline{y}$	середні значення вибірки (координати центра лінійної залежності);
x_i, y_i	i-та варіанта (i-та пара експериментальних значень x та y);
$\overline{x} \pm \Delta_{\overline{x}}$	граничні значення довірчого інтервалу середнього результату;
$x_i \pm \Delta_x$	граничні значення довірчого інтервалу результату одиничного визначення;
γ	критична статистика;
Δ_x	напівширина довірчого інтервалу одиничного визначення;
$\Delta_{\overline{x}}$	напівширина довірчого інтервалу середнього результату;

$\Delta_{x,r}$	напівширина відносного довірчого інтервалу одиничного визначення;
$\Delta_{\overline{x},r}$	напівширина відносного довірчого інтервалу середнього результату;
$\Delta_{As,r}$	сумарна невизначеність аналізу;
$\Delta_{FAO,r}$	невизначеність кінцевої аналітичної операції;
$\Delta_{RS,r}$	невизначеність атестації стандартного зразка;
$\Delta_{SP,r}$	невизначеність пробопідготовки;
δ	відносна величина систематичної похибки;
ε, $\overline{\varepsilon}$	відносні невизначеності відповідно результату окремого визначення і середнього результату;
μ	справжнє значення вимірюваної величини;
v	число ступенів свободи; перемінний обсяг вибірки при послідовному аналізі;
v_p	об'єднане число ступенів свободи;
v_{eff}	«ефективне» число ступенів свободи в підході Уелча-Сатертуейта;
Σ	знак підсумовування (сума);
σ	стандартне відхилення генеральної сукупності,
σ^2	дисперсія генеральної сукупності;
χ^2	критерій «хі-квадрат».

Метрологічні характеристики методик і результатів, одержуваних при статистичній обробці даних експерименту, дозволяють проводити оцінку та порівняння як експериментальних методик, так і досліджуваних об'єктів і на цій підставі розв'язувати низку прикладних задач, пов'язаних із визначенням статистичної вірогідності результатів випробування. Зокрема, описані нижче статистичні підходи та метрологічні характеристики використовують при валідації розроблюваних методик і для оцінки коректності одержаних результатів аналізу.

У розділах 1–8 викладені підходи, що застосовуються при статистичному аналізі результатів, які є функцією однієї випадкової змінної. Застосування цих підходів для функції декількох випадкових змінних описано в розділі 9. У розділі 10 наведені необхідні статистичні таблиці.

При викладі матеріалу використовують терміни, прийняті у загальній статті *5.3.N.2. Валідація аналітичних методик і випробувань.*

1. ВИБІРКА

Терміном «вибірка» позначають сукупність статистично еквівалентних результатів (варіант). Як таку сукупність можна, наприклад, розглядати ряд результатів, одержаних при рівнобіжних визначеннях вмісту речовини в однорідній за складом пробі.

Окремі значення варіант вибірки обсягу n прийнято позначати через x_i ($1 \le i \le n$). Упорядкована у порядку зростання вибірка може бути подана у вигляді

$$x_1; x_2; ...x_i; ...x_{n-1}; x_n. \qquad (1.1)$$

Результати, одержані при статистичній обробці вибірки, будуть вірогідні, лише якщо ця вибірка однорідна. Перевірка однорідності вибірки разглядається в розділі 1.2. Але, якщо метою випробувань є перевірка однорідності серії препарату (наприклад, при проведенні випробування «Однорідність вмісту діючої речовини в одиниці дозованого лікарського засобу»), оцінюють усі одержані результати (значення варіант) без попередньої перевірки однорідності вибірки.

1.1. СЕРЕДНЄ ЗНАЧЕННЯ ТА СТАНДАРТНЕ ВІДХИЛЕННЯ

У більшості випадків середнє вибірки $\overline{x}$ є найкращою оцінкою справжнього значення вимірюваної величини μ, якщо його обчислюють як середнє арифметичне усіх варіант:

$$\overline{x} = \frac{\sum_1^n x_i}{n}. \qquad (1.2)$$

При цьому розкид варіант x_i навколо середнього $\overline{x}$ характеризується величиною стандартного відхилення s. У кількісному хімічному аналізі величина s часто розглядається як міра випадкової похибки, властивої даній методиці аналізу. Квадрат цієї величини s^2 називають дисперсією. Величина дисперсії може розглядатися як міра

відтворюваності (збіжності) результатів, поданих у даній вибірці. Обчислення величин s^2 і s проводять за рівняннями 1.5 і 1.6. Іноді для цього попередньо визначають значення відхилень d_i і число ступенів свободи (число незалежних варіант) ν:

$$d_i = x_i - \overline{x}, \quad (1.3)$$

$$\nu = n - 1, \quad (1.4)$$

$$s^2 = \frac{\sum_{i=1}^{n} d_i^2}{\nu} = \frac{\sum_{i=1}^{n} x_i^2 - n \times \overline{x}^2}{\nu}, \quad (1.5)$$

$$s = \sqrt{s^2}. \quad (1.6)$$

Стандартне відхилення середнього результату $s_{\overline{x}}$ обчислюють за формулою:

$$s_{\overline{x}} = \frac{s_x}{\sqrt{n}} \quad (1.7)$$

Зазвичай при контролі якості лікарських засобів доцільно використовувати відносні (по відношенню до $\overline{x}$) величини — відносне стандартне відхилення s_r, відносну дисперсію s_r^2 і відносне стандартне відхилення середнього результату $s_{\overline{x},r}$. Їх обчислюють за формулами:

$$s_r^2 = \frac{s^2}{\overline{x}^2}, \quad (1.5a)$$

$$s_r = \frac{s}{\overline{x}}, \quad (1.6a)$$

$$s_{\overline{x},r} = \frac{s_r}{\sqrt{n}}. \quad (1.7a)$$

Ці відносні величини, залежно від розв'язуваної задачі, можуть виражатися також і у відсотках до $\overline{x}$. У цьому разі вони часто позначаються відповідно як *RSD* і $RSD_{\overline{x}}$:

$$RSD = s_r \times 100\ \%, \quad (1.6b)$$

$$RSD_{\overline{x}} = s_{\overline{x},r} \times 100\ \%. \quad (1.7b)$$

У фармакопейному аналізі абсолютні величини зазвичай використовують для прямих, а відносні — для непрямих методів аналізу.

Приклад обчислень наведений у розділі 8.1.

Якщо при вимірюваннях одержують логарифми шуканих варіант, середнє вибірки обчислюють як середнє геометричне, використовуючи логарифм варіант:

$$\lg \overline{x}_g = \frac{\sum_{i=1}^{n} \lg x_i}{n} \quad (1.8)$$

звідки:

$$\overline{x}_g = \sqrt[n]{x_1 \times x_2 \times \ldots x_n} = anti \lg \left(\lg \overline{x}_g \right). \quad (1.9)$$

Значення s^2, s і $s_{\overline{x}}$ у цьому разі також розраховують виходячи з логарифмів варіант і позначають відповідно через $s_{\lg}^2$, $s_{\lg}$ і $s_{\lg \overline{x}}$.

1.2. ПЕРЕВІРКА ОДНОРІДНОСТІ ВИБІРКИ. ВИКЛЮЧЕННЯ ЗНАЧЕНЬ ВАРІАНТ, ЩО ВИПАДАЮТЬ

Як було зазначено вище, значення $\overline{x}$, s^2, s і $s_{\overline{x}}$ можуть бути визнані вірогідними, якщо жодна з варіант вибірки не обтяжена грубою похибкою, тобто якщо вибірка однорідна. Виявлення грубих похибок — дуже складне завдання, щодо якого в літературі немає єдиної усталеної думки (див. розділ 7.3. статті 5.3. *Статистичний аналіз результатів біологічних випробувань і кількісних визначень*). Це особливо стосується вибірок, зовсім малих за обсягом (3–5 вимірювань). Нижче наводяться підходи, що найчастіше використовують для перевірки однорідності вибірок, малих ($n \leq 10$) та великих ($n > 10$) за обсягом.

1.2.1. Вибірки, малі за обсягом

Перевірка однорідності вибірок, малих за обсягом ($n \leq 10$), здійснюється без попереднього обчислення статистичних характеристик. Із цією метою після подання вибірки у вигляді (1.1) для крайніх варіант x_1 і x_n (які передбачаються такими, що випадають) розраховують значення контрольного критерію Q виходячи зі значення розмаху варіювання R:

$$R = \begin{cases} |x_1 - x_n| & \text{для } n = 3 \ldots 7 \\ |x_1 - x_{n-1}| & \text{для } n = 8 \ldots 10 \end{cases}, \quad (1.10)$$

$$Q_1 = \frac{|x_1 - x_2|}{R}, \quad (1.11a)$$

$$Q_n = \frac{|x_n - x_{n-1}|}{R}. \quad (1.11b)$$

Вибірка визнається неоднорідною, якщо хоча б одне з обчислених значень Q_1 чи Q_n перевищує табличне значення $Q(P_1, n)$, знайдене для довірчої імовірності P_1 (див. Табл. 10.1 Додатка). Варіанти x_1 або x_n, для яких відповідне значення $Q > Q(P_1, n)$, відкидаються, і для одержаної вибірки зменшеного обсягу виконують новий цикл

обчислень за рівняннями 1.10 і 1.11 із метою перевірки її однорідності.

Якщо у вихідній вибірці виконуються нерівності $|x_1 - x_2| < |x_2 - x_3|$ і $|x_n - x_{n-1}| < |x_{n-1} - x_{n-2}|$, то рівняння (1.11а) і (1.11б) набувають вигляду:

$$Q_1 = \frac{|x_2 - x_3|}{R}, \quad Q_n = \frac{x_{n-1} - x_{n-2}}{R}. \quad (1.12)$$

Одержану в кінцевому підсумку однорідну вибірку використовують для обчислення $\overline{x}$, s^2, s і $s_{\overline{x}}$.

Приклад обчислень наведений у розділі 8.2.

Застосування підходу, що оснований на співвідношеннях (1.10–1.12), накладає обмеження на достатню чутливість шкали вимірювань (див. розділ 1.2.3).

1.2.2. Вибірки, великі за обсягом

Для вибірок, великих за обсягом ($n > 10$), перевірку однорідності проводять після попереднього обчислення статистичних характеристик $\overline{x}$, s^2, s і $s_{\overline{x}}$. При цьому вибірка визнається однорідною, якщо для усіх варіант відхилення d_i (1.3) задовольняє вимоги 3s-критерію:

$$|d_i| \le 3 \times s. \quad (1.13)$$

Якщо вибірка визнана неоднорідною, варіанти, для яких $|d_i| > 3s$, відкидаються як обтяжені грубими похибками з довірчою ймовірністю $P_2 > 99.0\,\%$. У цьому разі для одержаної вибірки скороченого обсягу повторюють цикл обчислень статистичних характеристик за формулами (1.2–1.7) і знову проводять перевірку однорідності. Обчислення статистичних характеристик вважають закінченим, коли вибірка скороченого об'єму виявляється однорідною.

Приклад застосування 3s-критерію (1.12) для виключення варіант, що випадають, наведений у розділі 8.9.2.

1.2.3. Загальні зауваження щодо ідентифікації варіант, що випадають

Для малих вибірок існує практична проблема недостатньої чутливості шкали вимірювань. Якщо завдяки занадто грубій шкалі усі варіанти, за винятком одного значення, співпадають, то, незалежно від того, як така варіанта відрізняється від інших, вона буде помилково детектуватися як така, що випадає. Така ситуація може зустрічатися для невеликої кількості варіант.

Наприклад, в експерименті були одержані такі значення оптичної густини: 0.4335, 0.4334, 0.4335. Згідно з підходом 1.2.1, величина 0.4334 випадає, що є абсурдним.

Для коректного застосування підходу розділу 1.2.1 необхідно, щоб мінімальний крок шкали вимірювань (d) був незначущий порівнюючи з розмахом варіювання R. Тобто, згідно зі співвідношенням (2.6), має виконуватися нерівність:

$$d \le 0.32 \times R.$$

При малих вибірках великою є невизначеність статистичних характеристик, що призводить до високої статистичної незначущості грубих похибок. Так, із Табл. 10.1 Додатка видно, що $Q = 0.94$ для $n = 3$ (така кількість паралельних випробувань є звичайною для рутинного аналізу) і $p = 0.95$. Це означає, що якщо у нас, наприклад, значення x_3 значно відрізняється від x_1 і x_2, то ми можемо його виключити тільки у тому випадку, коли різниця $|x_2 - x_3|$ буде у 20 разів більшою, ніж $|x_1 - x_2|$ (див. рівняння (1.10–1.11). У випадку $p = 0.99$ така різниця має бути у 100 разів більше. Ці приклади ілюструють обмеженість на практиці застосування для малих вибірок чисто статистичних критеріїв для ідентифікації варіант, що випадають.

По мірі збільшення вибірки зменшується невизначеність статистичних характеристик, але й збільшується вірогідність великих відхилень від середнього результату. Якщо, наприклад, вірогідність для однієї варіанти потрапити у якийсь довірчий інтервал становить $p_1 = 0.99$, то вірогідність того, що всі n варіант потраплять у цей самий інтервал дорівнює $p_n = 0.99^n$. Відповідно, вірогідність того, що хоча б одна з цих n варіант не попаде у цей довірчий інтервал, дорівнює $p_{0,n} = 1 - 0.99^n$. Розрахунки показують, що навіть для вибірки $n = 10$ вірогідність $p_{0,n} = 0.10$ (тобто перевищує прийнятний в статистиці рівень значимості 0.05), для $n = 30$ маємо $p_{0,n} = 0.26$, а для $n = 80$ маємо $p_{0,n} = 0.55$, тобто більше половини.

Тому для ідентифікації варіант, що випадають за думкою дослідника (наприклад, з точки зору загальної аналітичної практики), залучають, крім суто статистичних, також інші підходи (див. розділ 6.4).

1.3. ОБ'ЄДНАННЯ ВИБІРОК

1.3.1. Об'єднана дисперсія й об'єднане середнє

Якщо є g вибірок із однієї генеральної сукупності з порядковими номерами k ($1 \le k \le g$), розрахунок дисперсії s_p^2 проводять за формулою:

$$s_p^2 = \frac{\sum_{k=1}^{k=g}\sum_{i=1}^{i=n_k} d_{ik}^2}{v_p} = \frac{\sum_{k=1}^{k=g}\left[(n_k - 1)\times s_k^2\right]}{v_p} = \frac{\sum_{k=1}^{k=g} v_k \times s_k^2}{v_p}, \quad (1.14)$$

або для відносних величин:

$$s_{p,r}^2 = \frac{\sum_{k=1}^{k=g} \nu_k \times s_{k,r}^2}{\nu_p}, \quad (1.14a)$$

$$RSD_p^2 = \frac{\sum_{k=1}^{k=g} \nu_k \times RSD_k^2}{\nu_p}, \quad (1.14b)$$

При цьому об'єднане число ступенів свободи v_p дорівнює:

$$v_p = \sum_{k=1}^{g} v_k, \quad (1.15)$$

де n_k — число варіант у k-тій вибірці;
v_k — число ступенів свободи в k-тій вибірці;
s_k^2 — дисперсія k-тої вибірки;
$s_{k,r}^2$ — відносна дисперсія k-тої вибірки;
d_{ik} — відхилення i-тої варіанти k-тої вибірки.

Якщо g вибірок із однієї генеральної сукупності з порядковими номерами k ($1 \le k \le g$) характеризуються вибірковими середніми значеннями $\overline{x}_k$, отриманими з n_k варіант, середнє значення $\overline{x}$ по усіх вибірках обчислюють за формулою:

$$\overline{x} = \frac{\sum_{k=1}^{k=g} n_k \times \overline{x}_k}{\sum_{k=1}^{k=g} n_k}. \quad (1.16)$$

Необхідною умовою спільної статистичної обробки декількох вибірок є справедливість гіпотези рівності дисперсій, тобто відсутність статистично значущої різниці між окремими значеннями s_k^2 із рівняння (1.14), $s_{k,r}^2$ із рівняння (1.14a) або RSD_k^2 із рівняння (1.14b). У найпростішому випадку можна обмежитися порівнянням граничних значень s_k^2 із використанням критерію Фішера F, як зазначено в розділі 3. У більш загальному випадку використовують критерії Бартлета та Кокрена.

1.3.2. Критерій Бартлета

Для перевірки гіпотези, що усі $s_{k,r}^2$ належать до однієї генеральної сукупності, використовують вираз, наближено розподілений як χ^2:

$$\chi^2 = 2.303 \times \left(\nu_p \times \lg s^2 - \sum_{k=1}^{g} \nu_k \times \lg s_k^2 \right). \quad (1.17)$$

При цьому величини s і v_p обчислюють за формулами (1.14) і (1.15). Знайдену в такий спосіб величину χ^2 порівнюють із відстковою точкою хі-квадрат розподілу $\chi^2(P_1, v_\chi)$ (Табл. 10.4 Додатка). Якщо є g вибірок, число ступенів свободи для $\chi^2(P_1, \nu_\chi)$ береться рівним $v_\chi = g$-1. Перевірювана гіпотеза приймається за умови $\chi^2 < \chi^2(P_1, \nu_\chi)$. А якщо ні, обчислене значення χ^2 корегують за формулою:

$$\chi^{*2} = \frac{\chi^2}{C},$$

де (1.18)

$$C = \frac{\left[\sum_{k=1}^{g}(1/v_k)\right] - 1/v_p}{3\times(g-1)} + 1,$$

і знову порівнюють із відстковою точкою хі-квадрат розподілу $\chi^2(P_1, v_\chi)$. Якщо $\chi^{*2} > \chi^2(P_1, v_\chi)$, між деякими стандартними відхиленнями є значущі розходження. У цьому разі необхідно провести аналіз наявних даних, відкинути одне чи декілька значень дисперсії, що найбільше відрізняються від інших, і знову провести тест Бартлета. Слід мати на увазі, що критерій Бартлета (так само як і критерій Кокрена) дуже чутливий до порушення вимоги нормальності. Але саме тому він може бути дуже корисним при формуванні надійних аналітичних архівів.

Описаний критерій Бартлета застосовний лише за умови, що число ступенів свободи у всіх поєднуваних дисперсій більше 3 (тобто всі $\nu_k > 3$). Однак саме протилежний випадок ($\nu_k \le 3$) нерідко і становить найбільший інтерес. Тому Бартлетом була запропонована більш складна модифікація даного критерію, застосовна при будь-яких ступенях свободи. Однак використання її на практиці досить важке без застосування комп'ютерних програм.

Критерій Бартлета не може бути застосовний, якщо через занадто грубу шкалу вимірювань хоча б одне з s_k дорівнює нулю (бо $lg0$ не має сенсу). Слід відзначити, що справжнє значення стандартного відхилення не може дорівнювати нулю. Якщо покласти, що мінімальний крок шкали вимірювань (d) відповідає довірчому інтервалу для рівня значущості 99 %, то коефіцієнт Гауса дорівнює 2.44. У цьому випадку отримаємо[1]:

$$s_k \ge (1/2.44) \times d = 0.41 \times d.$$

Цю величину s_k рекомендується використовувати у формулах (1.17–1.18) замість $s_k = 0$.

(1) USP 38, <41> Balances.

1.3.3. Критерій Кокрена

Якщо всі поєднувані дисперсії мають однакове число ступенів свободи (тобто $v_1 = v_2 = ... = v_g = v$), для перевірки гіпотези рівності дисперсій можна застосовувати значно простіший критерій Кокрена зі статистикою:

$$G = \frac{s^2_{\max}}{\sum_{k=1}^{g} s_k^2}, \qquad (1.19)$$

$$s^2_{\max} = \max(s_k^2).$$

Критичні точки критерію Кокрена наведені в Табл. 10.4 Додатка. Розраховане значення G на обраному рівні значущості (95 % або 99 %) не має перевищувати табличне значення. В іншому разі гіпотеза рівності дисперсій не може бути прийнята, і формули (1.14–1.16) об'єднання вибірок не є коректними.

У рівняннях (1.17) і (1.19) замість абсолютних дисперсій s_k^2 можуть використовуватися відносні величини $s^2_{k,r}$ та RSD_k. Приклади застосування критеріїв Бартлета і Кокрена наведені в розділі 8.4.

1.4. ДОВІРЧІ ІНТЕРВАЛИ Й ОЦІНКА ЇХ ВЕЛИЧИНИ

Якщо випадкова однорідна вибірка кінцевого обсягу n одержана в результаті послідовних вимірювань деякої величини A, що має справжнє значення μ, середнє цієї вибірки $\overline{x}$ слід розглядати лише як наближену оцінку A. Невизначеність цієї оцінки характеризується величиною довірчого інтервалу $\overline{x} \pm \Delta_{\overline{x}}$, в якому з заданою двобічною довірчою ймовірністю P_2 знаходиться справжнє значення μ, тобто виконується умова:

$$\overline{x} - \Delta_{\overline{x}} \le \mu \le \overline{x} + \Delta_{\overline{x}}. \qquad (1.20)$$

Слід зазначити, що даний довірчий інтервал не характеризує (як іноді вважається) похибку визначення величини μ. Знайдена величина $\overline{x}$ може бути насправді дуже близькою до справжнього значення μ, але справжнє значення невідоме. Одержаний довірчий інтервал характеризує ступінь невизначеності наших знань про справжнє значення μ величини A за результатами послідовних вимірювань вибірки кінцевого обсягу n.

Довірчий інтервал є окремим випадком так званої «розширеної невизначеності», яка широко застосовується в різних керівництвах. Треба відрізняти її від «стандартної невизначеності», яка є аналогом стандартного відхилення. Надалі, якщо не зазначено особисто, під невизначеністю розуміють довірчий інтервал, зазвичай для рівня значущості 95 %.

Розрахунок граничних значень довірчого інтервалу при відомому значенні стандартного відхилення σ або для вибірок великих за обсягом проводять за рівнянням:

$$\overline{x} \pm \Delta_{\overline{x}} = \overline{x} \pm \frac{U(P) \times \sigma}{\sqrt{n}}, \qquad (1.21)$$

припускаючи, що варіанти, що входять до вибірки, розподілені нормально. При цьому $U(P)$ — табличне значення функції нормального розподілу.

При невідомому значенні стандартного відхилення s для вибірок, невеликих за обсягом, граничні значення довірчого інтервалу розраховують із використанням критерію Стьюдента:

$$\overline{x} \pm \Delta_{\overline{x}} = \overline{x} \pm \frac{t(P,v) \times s}{\sqrt{n}}, \qquad (1.22)$$

або з використанням відносних величин:

$$1 \pm \frac{\Delta_{\overline{x}}}{\overline{x}} = 1 \pm \Delta_{\overline{x},r} = 1 \pm \frac{t(P,v) \times s_r}{\sqrt{n}} \quad (1.22а)$$

де $t(P,v)$ — табличне значення критерію Стьюдента (див. Табл. 10.2). Розподіл Стьюдента $t(P, v)$ є узагальненням нормального розподілу $U(P)$ і переходить у нього при достатньо великому числі ступенів свободи v, тобто $t(P, v) \to U(P)$. Враховуючи це, для уніфікації далі скрізь будуть використовуватися більш загальні співвідношення (1.22) і (1.22а), навіть якщо йдеться про обробку досить великих вибірок.

Напівширини відносних довірчих інтервалів одиничного ($\Delta_{x,r}$) і середнього ($\Delta_{\overline{x},r}$) результатів часто виражають у відсотках до $\overline{x}$. У цьому разі у виразі (1.22а) замість величини s_r використовують RSD, а замість одиниці беруть 100 %, тобто:

$$100 \pm \Delta_{\overline{x},r}\ \% = 100 \pm \frac{t(P,v) \times RSD}{\sqrt{n}}. \quad (1.23)$$

Якщо при вимірюванні за тією ж самою методикою різних значень величини A були одержані дві випадкові однорідні вибірки обсягом n і m, то при $m < n$ для вибірки обсягом m справедливий вираз:

$$\overline{x}_{(m)} \pm \Delta_{\overline{x}_{(m)}} = \overline{x}_{(m)} \pm \frac{t(P,\nu_{(n)}) \times S_{(n)}}{\sqrt{m}} \quad (1.24)$$

(індекс означає належність величин до вибірки обсягом *m* чи *n*).

Вираз (1.24) дозволяє оцінити величину довірчого інтервалу середнього $\overline{x}_{(m)}$, знайденого для вибірки обсягом *m*. Інакше кажучи, довірчий інтервал середнього $\overline{x}_{(m)}$ вибірки відносно малого обсягу *m* може бути звужений завдяки використанню відомих величин $s_{(n)}$ і $t(P, v_{(n)})$, знайдених раніше для вибірки більшого обсягу *n*.

Більш загальним підходом для звуження довірчого інтервалу є об'єднання вибірок із розрахунком об'єднаного стандартного відхилення та ступенів свободи за рівняннями (1.14–1.15). Це стандартне відхилення і відповідний об'єднаному числу ступенів свободи критерій Стьюдента підставляють потім у вираз (1.24).

Аналогічно (1.20–1.22) визначається довірчий інтервал окремого визначення. Підставляючи $n = 1$ у вираз (1.22), маємо:

$$x_i \pm \Delta_x = x_i \pm t(P, v) \times s \qquad (1.25)$$

або з використанням відносних величин:

$$\frac{x_i}{\overline{x}} \pm \Delta_{x,r} = \frac{x_i}{\overline{x}} \pm t(P,\nu) \times s_r. \quad (1.25a)$$

Цей інтервал є довірчим інтервалом результату окремого визначення. Для нього з довірчою ймовірністю *P* виконуються взаємозалежні умови:

$$x_i - \Delta_x \le \mu \le x_i + \Delta_x. \qquad (1.26)$$

$$\mu - \Delta_x \le x_i \le \mu + \Delta_x. \qquad (1.27)$$

Значення $\Delta_{\overline{x}}$ і Δ_x із виразів (1.20) і (1.22) використовують при обчисленні відносних невизначеностей окремої варіанти (ε) і середнього результату ($\overline{\varepsilon}$), виражаючи ці величини у відсотках:

$$\varepsilon = \Delta_{x,r} \times 100 = \frac{\Delta_x}{\overline{x}} \times 100\ \%, \quad (1.28)$$

$$\overline{\varepsilon} = \Delta_{\overline{x},r} \times 100 = \frac{\Delta_{\overline{x}}}{\overline{x}} \times 100\ \%. \quad (1.28a)$$

Приклад обчислень наведений у розділі 8.3.

Якщо при вимірюваннях одержують логарифми вихідних варіант, вирази (1.22) і (1.25) набувають вигляду:

$$\lg \overline{x} \pm \Delta_{\lg \overline{x}} = \lg \overline{x} \pm \frac{t(P,\nu) \times s_{\lg}}{\sqrt{n}}, \quad (1.29)$$

$$\lg x_i \pm \Delta_{\lg x} = \lg x_i \pm t(P,v) \times s_{\lg}. \quad (1.30)$$

Потенціювання виразів (1.29) і (1.30) призводить до несиметричних довірчих інтервалів для значень $\overline{x}$ і x_i:

$$anti\lg(\lg \overline{x} - \Delta_{\lg \overline{x}}) \le \overline{x} \le anti\lg(\lg \overline{x} + \Delta_{\lg \overline{x}}), (1.31)$$

$$anti\lg(\lg x_i - \Delta_{\lg x}) \le x_i \le anti\lg(\lg x_i + \Delta_{\lg x}), (1.32)$$

де

$$\Delta_{\lg \overline{x}} = \frac{t(P,\nu) \times s_{\lg}}{\sqrt{n}}, \qquad (1.33)$$

$$\Delta_{\lg x} = t(P,v) \times s_{\lg}. \qquad (1.34)$$

При цьому для нижніх і верхніх меж довірчих інтервалів $\overline{x}$ і x_i маємо:

$$\overline{\varepsilon} = \left[\frac{\left| anti\lg(\lg \overline{x} \pm \Delta_{\lg \overline{x}}) - \overline{x} \right|}{\overline{x}} \right] \times 100\ \%, \quad (1.35a)$$

$$\varepsilon = \left[\frac{\left| anti\lg(\lg x_i \pm \Delta_{\lg x}) - x_i \right|}{x_i} \right] \times 100\ \%. (1.35b)$$

1.5. ОДНОБІЧНІ ТА ДВОБІЧНІ ДОВІРЧІ ІНТЕРВАЛИ

Співвідношення (1.20–1.35) характеризують так звані «двобічні» довірчі інтервали. Вони базуються на двобічному *t*-розподілі та широко застосовуються при оцінюванні невизначеності методик і поданні результатів. Однак при вирішенні питань гарантії якості продукції (див. розділ 6.3), а також при контролі серійної продукції, зокрема при контролі якості готових лікарських засобів, нерідко виникає необхідність використання так званих «однобічних» довірчих інтервалів.

Наприклад, для готового лікарського засобу межі вмісту активного компонента встановлені 90–110 % від номінального. У процесі аналізу одержане середнє значення вмісту $\overline{x}$ = 92 % від номінального значення. Нас цікавить, чи не виходить довірчий інтервал за межі вмісту (90–110 %). Очевидно, що в даному разі цей довірчий інтервал може вийти тільки за нижню межу (90 %), але не за нижню й верхню (110 %) межі одночасно. Питання про можливість виходу справжньої величини μ за верхню межу нас у даному разі не цікавить (у зв'язку з його вкрай низькою ймовірністю). Отже, можна вважати, що з заданою однобічною довірчою ймовірністю P_1 справжнє значення μ знаходиться в інтервалі:

$$\overline{x} - \Delta_{\overline{x}} \le \mu \le \infty. \qquad (1.36a)$$

Аналогічний вираз можна записати для випадку, коли $\overline{x}$ перевищує 100 % (наприклад, $\overline{x}$ = 105 %):

$$-\infty \le \mu \le \overline{x} + \Delta_{\overline{x}}. \qquad (1.36b)$$

Комбінація (1.36a) і (1.36b) дає співвідношення:

$$\overline{x} - \Delta_{\overline{x}} \le \mu \le \overline{x} + \Delta_{\overline{x}}. \qquad (1.36c)$$

Це співвідношення по формі нічим не відрізняється від довірчого інтервалу (1.20), але статичний зміст його інший: з заданою довірчою ймовірністю P_1 справжнє значення μ не виходить за нижню або верхню межу довірчого інтервалу (1.36c).

Співвідношення (1.36a–1.36c) характеризують однобічні довірчі інтервали, оскільки величина μ ними обмежується лише з одного боку. Це відрізняє їх від співвідношення (1.20), де величина μ обмежується з обох боків. Табличні значення критерію Стьюдента для однобічного і двобічного розподілу наведені в Табл. 10.2. Існує таке співвідношення між двобічним (P_2) і однобічним (P_1) критеріями Стьюдента:

$$t[P_2, v] = t[(2P_1 - 100), v]. \qquad (1.37)$$

Зокрема, однобічний критерій Стьюдента для ймовірності 95 % збігається із двобічним критерієм Стьюдента для ймовірності 90 %.

От же, P_2 — це імовірність того, що математичне очікування (або справжнє значення) оцінюваної величини знаходиться у двобічно обмежених інтервалах (1.20–1.35), а P_1 — це імовірність того, що воно знаходиться в однобічно обмежених інтервалах (1.36–1.37). Виходячи зі свого смислу, величини P_2 і P_1 у цьому випадку також часто називають рівнем значущості або надійністю того, що математичне сподівання (або справжнє значення) оцінюваної величини знаходиться у цих двобічно або однобічно обмежених інтервалах.

У літературі (зокрема, у таблицях) нерідко використовують величини (які по-різному позначаються) $(100 - P_2)$ і $(100 - P_1)$, що характеризують імовірність того, що математичне сподівання (або справжнє значення) оцінюваної величини виходить за зазначені вище межі. У багатьох випадках такі величини є більш зручними.

2. МЕТРОЛОГІЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ МЕТОДИКИ АНАЛІЗУ

2.1. ПРЕДСТАВЛЕННЯ МЕТРОЛОГІЧНИХ ХАРАКТЕРИСТИК

Метрологічні характеристики методики встановлюють шляхом статистичної обробки однієї вибірки або спільної статистичної обробки декількох вибірок із тієї самої генеральної сукупності. Як такі вибірки можуть використовуватися дані аналітичного архіву лабораторії або результати, одержані при аналізі зразків із відомим вмістом визначуваного компонента μ. Якщо ми маємо справу тільки з однією випадковою змінною, то результати статистичної обробки можуть бути подані у вигляді Табл. 2.1. Статистична обробка функції декількох випадкових змінних розглядається у розділі 9.

Зазвичай простіше використовувати відносні величини. Результати статистичної обробки можуть бути представлені в цьому випадку у вигляді Табл. 2.1а.

2.2. ФОРМУЛЮВАННЯ АНАЛІТИЧНОЇ ЗАДАЧІ

Оцінка метрологічних характеристик результатів аналізу і самої методики аналізу передбачає постановку аналітичної задачі – для якої цілі ця методика використовується. З цього погляду, слід розрізнювати визначення концентрації деякої речовини в якомусь об'єкті (наприклад, визначення вмісту кислоти ацетилсаліцилової у таблетках) від контролю якості цього ж об'єкта (таблеток кислоти ацетилсаліцилової) за показником вмісту кислоти ацетилсаліцилової. Прийнятні значення метрологічних характеристик для цих випадків можуть бути суттєво різними.

Таблиця 2.1

Метрологічні характеристики методики аналізу. Абсолютні величини

μ	v	$\overline{x}$	s	P	$t(P, v)$	Δ_x	ε	$\delta_{абс}$
1	2	3	4	5	6	7	8	9

Таблиця 2.1а

Метрологічні характеристики методики аналізу. Відносні величини

μ	v	$\overline{x}/\mu$	s	s_r	P	$t(P, v)$	$\Delta_{x,r}$	ε	δ
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

Якщо аналітична задача — визначення концентрації (наприклад, вмісту кислоти ацетилсаліцилової у таблетках), то це означає, що нас цікавить саме концентрація, яка має бути визначена в заданому аналітичному діапазоні із заданою правильністю і прецизійністю (яка характеризується довірчим інтервалом). Така постановка задачі характерна, наприклад, при вивченні стабільності, профілів розчинення при доведенні біоеквівалентності *in vitro*, аналізі тенденцій або кількісному визначенні в окремих таблетках при проведенні випробування на однорідність вмісту.

Якщо аналітична задача — контроль якості якоїсь серійної продукції (наприклад, лікарського засобу) за показником «Кількісне визначення», то постановка задачі інша. Контроль якості передбачає, що ми з певним ступенем надійності (з яким — необхідно визначитись) робимо висновок про те, знаходиться концентрація речовини, що аналізується, в припустимих межах (допусках) чи ні. Якщо знаходиться, то препарат якісний, якщо ні — бракований. При цьому саме значення концентрації, у загальному випадку, нас може і не цікавити. Прикладом є кількісне визначення більшості фармакопейних субстанцій із симетричними допусками вмісту. Отримані у такому випадку результати не характеризують кількісний вміст основної речовини (його можна значно точніше обчислити, віднявши від 100 % вміст домішок). Задача інша — показати, що отриманий результат статистично значуще не відрізняється від 100 %.

2.3. ОСОБЛИВОСТІ КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ ЗА ПОКАЗНИКОМ «КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ»

2.3.1. Загальні положення

Контроль якості лікарських засобів має низку особливостей, які відрізняють його від аналізу інших об'єктів.

1. Незважаючи на намагання виробника забезпечити однорідність серій, що виробляються, досягти абсолютної гомогенності теоретично неможливо. Тому готові лікарські засоби є в загальному сенсі неоднорідними за концентраціями діючих речовин. У випадку дозованих лікарських засобів (таблетки, капсули, супозиторії тощо) ця неоднорідність регламентується вимогами статті *2.9.40 Однорідність дозованих одиниць*. Фактори неоднорідності готових лікарських засобів призводять до того, що за результатами аналізу декількох окремих одиниць продукції важко з прийнятною невизначеністю оцінити генеральне значення вмісту в лікарському засобі речовини, що аналізується. Це означає, зокрема, що отриманий в експерименті довірчий інтервал характеризує тільки збіжність результатів і може не вміщувати генеральне середнє.
2. Беручи до уваги фактори неоднорідності, а також інші чинники, при оцінці результатів і прийнятті рішень про якість лікарських засобів доцільно використовувати не фактичні метрологічні характеристики (які можуть значно відрізнятися в різних лабораторіях), а їхні максимально допустимі значення.
3. Якість лікарських засобів регламентується вимогами монографії Фармакопеї або специфікації виробника.
4. Концентрації речовин, що аналізуються за ними, у випадку двобічного нормування мають знаходитися в межах від $100 - B_{Low}$ до $100 + B_{High}$. Зазвичай допуски вмісту є симетричними, тобто $100 \pm B$. Далі розглядається саме цей випадок.
5. Згідно з підходом Фармакопеї, ці допуски мають вміщувати в собі *всі* фактори варіабельності – як технологічні (зокрема, фактори неоднорідності), так і аналітичні (зокрема, невизначеність аналітичної методики). Для спрощення ми не розглядаємо вплив фактора нестабільності, оскільки переважна більшість фармакопейних субстанцій є стабільними речовинами.
6. Фармакопея у відповідних загальних і окремих статтях встановлює загальні вимоги до мірного посуду, реактивів, аналітичного обладнання, стандартних зразків тощо. Ці вимоги, разом з урахованими вимогами специфікації, визначають максимально допустиму (з погляду Фармакопеї) невизначеність методики контролю якості лікарського засобу ($max\Delta_{As}$). Якщо лабораторія проводить контроль якості лікарського засобу відповідно до цих вимог (тобто з невизначеністю аналізу не вище $max\Delta_{As}$), то отримані нею результати не можуть бути поставлені під сумнів.
7. Метрологічні характеристики аналітичного обладнання (спектрофотометрів, хроматографів тощо) у різних контрольних лабораторіях можуть значно варіюватися, залишаючись при цьому відповідними вимогам Фармакопеї. Тому результати аналізу, отримані різними лабораторіями (наприклад, на

підприємствах і в лабораторіях державного контролю), можуть мати суттєво різну невизначеність, яка, однак, не має перевищувати $max\Delta_{As}$. Це може призводити до різних висновків про якість лікарського засобу в цих лабораторіях (наприклад, на підприємствах і в лабораторіях державного контролю). Для запобігання цьому виробникам доцільно встановлювати гарантуючі допуски для показників якості, що визначаються (зокрема, див. нижче).

Як видно, однією з найважливіших метрологічних характеристик при контролю якості лікарських засобів є максимально допустима невизначеність аналізу ($max\Delta_{As}$). Для її встановлення можуть бути запропоновані різні підходи.

У фармацевтичному аналізі існують два основних підходи, які відображають еволюцію ролі тесту «Кількісне визначення» в контролі якості субстанцій і готових лікарських засобів (ГЛЗ) і призводять до застосування різних вимог до максимально допустимої невизначеності аналізу. Ці підходи можна умовно назвати *«доказовим»* (ми *не знаємо* дійсного вмісту, знаходимо його і *доводимо*, що він знаходиться в потрібних межах) і *«підтверджуючим»* (ми *знаємо* дійсний вміст і *підтверджуємо* його).

2.3.2. Доказовий підхід

Цей підхід застосовний до ГЛЗ і деяких субстанцій.

Вихідні припущення. Невизначеність методики аналізу не є визначальною при встановленні допусків вмісту компонента, що аналізується. Загальна сума інших компонентів (в субстанціях — це домішки, в ГЛЗ – домішки і допоміжні речовини) не контролюється. Методи аналізу: неселективний — для субстанцій і ГЛЗ; селективний (хроматографія) — для ГЛЗ. Результати кількісного визначення можуть при цьому відповідати як реальним концентраціям компонента, що аналізується (при застосуванні селективного методу), так і деяким умовним величинам (концентраціям) (при застосуванні неселективного методу).

Розподіл концентрацій. (Умовні) концентрації для якісного препарату вважаються розподіленими за випадковим (гаусовим) законом біля 100 % (або іншої величини) в межах допусків специфікації. Зокрема, можливі і концентрації, які знаходяться на межах допусків.

Вимоги. Результати кількісного визначення, безвідносно до невизначеності методики аналізу, мають знаходитися в межах, що регламентуються монографією Фармакопеї або специфікацією виробника. Вихід за ці межі означає, що вміст домішок перевищує допустимий рівень (для субстанцій) або вміст компонента, що аналізується, виходить за межі, що регламентуються (для ГЛЗ).

Мета методики аналізу. Визначити, чи знаходяться (умовні) концентрації в межах, що регламентуються. Для того, щоб це довести, необхідно скористатися методикою аналізу, невизначеність якої суттєво менша за ці межі.

Для регламентації максимально допустимої невизначеності методики аналізу $max\Delta_{As}$ в доказовому підході можуть використовуватися різні підходи, зокрема принцип незначущості (див. розділ 2.4.2.1). При його використанні, згідно зі співвідношенням (2.6), максимальна невизначеність методики аналізу $max\Delta_{As}$ має відповідати нерівності:

$$max\Delta_{As} \le 0.32 \times B,$$

де B — півширина меж концентрації, що регламентується.

Доказовий підхід не викликає заперечень для ГЛЗ, у яких межі вмісту пов'язані переважно чином з неоднорідністю дозування діючої речовини і де результати аналізу мають важливе значення для зведення матеріального балансу і дослідження стабільності.

Не викликав цей підхід особливих заперечень і для субстанцій, поки для їхнього кількісного визначення використовувалися неселективні методи аналізу, а загальна сума домішок не регламентувалася. Однак з появою принципу «прозорості» монографій ситуація для субстанцій докорінно змінилася.

2.3.3. Підтверджуючий підхід

Цей підхід застосовується зазвичай для контролю якості субстанцій за показником «Кількісне визначення» і сьогодні є офіційним методом ЄФ/ДФУ.

Вихідні припущення. Усі домішки відомі і контролюються монографією або специфікацією. Межі вмісту основної речовини в субстанції встановлюються на підставі максимально допустимого вмісту домішок і невизначеності методики аналізу. При цьому враховується різна чутливість методики аналізу щодо домішок і основної речовини.

Розподіл концентрацій. Істинні концентрації основної речовини розподілені за випадковим

законом не в межах вимог специфікації, а в межах від (100 – сума домішок) % до 100 %. У межах специфікації розподілені випадковим чином не істинні концентрації, а результати, які отримані за методикою аналізу. Очевидно, що в цьому випадку верхній допуск вмісту основної речовини в субстанції B_{High} визначається тільки максимально допустимою невизначеністю методики аналізу, тобто

$$max\Delta_{As} \le 100 - B_{High}\,.$$

Вимоги. Результати кількісного визначення мають знаходитися в межах, які регламентуються монографією Фармакопеї або специфікацією. Оскільки всі домішки контролюються іншими випробуваннями (принцип «прозорості»), то вихід за ці межі (при вмісті домішок у межах вимог монографії або специфікації) можливий тільки з однієї причини — дана субстанція виробляється за технологією, яка не контролюється монографією Фармакопеї або специфікацією.

Мета методики аналізу. Підтвердити, що вміст основної речовини значуще не відрізняється від інтервалу [(100 – сума домішок) %, 100 %]. Як видно, в цьому випадку кількісне визначення втрачає своє колишнє значення і, фактично, виконує роль ідентифікації.

Слід відзначити, що підтверджуючий підхід є основним підходом у належних практиках. Усі метрологічні питання вирішуються на стадії валідації процесу, а при рутинному контролі підтверджується, що параметри процесу відповідають необхідним критеріям. Це дозволяє значно спростити контроль процесу.

2.4. ОЦІНКА ЗНАЧУЩОСТІ СИСТЕМАТИЧНОЇ ПОХИБКИ

За відомого вмісту визначуваного компонента μ у зразку необхідно оцінити значущість систематичної похибки (δ). Ця похибка може бути значущою (чи незначущою) статистично або практично.

Статистична значущість означає, що систематична похибка перевищує довірчий інтервал (для ймовірності *P*) результатів визначення величини, що аналізується. Тобто на рівні ймовірності *P* ми можемо говорити про наявність систематичної похибки. Для відносної величини систематичної похибки δ це означає (див. рівняння (1.23)):

$$\delta > \Delta_{\overline{x},r}\% = \frac{t(P,v)\times RSD}{\sqrt{n}} \qquad (2.1)$$

Зі співвідношення (2.1) видно, що величина напівширини відносного довірчого інтервалу $\Delta_{\overline{x},r}$ зменшується з ростом обсягу вибірки. Отже, збільшуючи обсяг вибірки *n* (що призводить до відповідного зменшення $\Delta_{\overline{x},r}$), можна, теоретично, будь-яку малу систематичну похибку δ зробити статистично значущою.

Тому, якщо нерівність (2.1) не виконується (тобто $\delta < \Delta_{\overline{x},r}$), то це не означає відсутність систематичної похибки. Це означає тільки, що ця систематична похибка δ є статистично незначущою в даній серії експерименту при даному обсязі вибірки *n*. В іншій серії експерименту (навіть при тому самому обсязі вибірки *n*) ми можемо отримати менше значення *RSD* (згідно з розподілом Фішера — Табл. 10.5, величини *RSD* в різних експериментах можуть значно різнитися) і, відповідно, менше значення $\Delta_{\overline{x},r}$. Тоді нерівність (2.1) може виконуватися ($\delta > \Delta_{\overline{x},r}$), тобто систематична похибка δ стає статистично значущою.

У той же час статистично значуща систематична похибка може бути прийнятною для развязання поставленої аналітичної задачі, якщо вона критично не впливає на прийняття рішення за результатами аналізу.

Практична значущість означає, що систематична похибка δ є значущою (тобто неприйнятною) для вирішення поставленої аналітичної задачі. Така систематична похибка має бути зменшена до прийнятного рівня шляхом доопрацювання методики. В протилежному випадку методика не може бути використана для вирішення поставленої аналітичної задачі, бо систематична похибка критично впливає на прийняття рішення за результатами аналізу.

2.4.1. Статистична значущість систематичної похибки

Обчислюють критерій Стьюдента *t*:

$$t = \frac{|\mu - \overline{x}| \times \sqrt{n}}{s} \qquad (2.2)$$

або у відносних величинах:

$$t = \frac{\left|1 - \dfrac{\overline{x}}{\mu}\right| \times \sqrt{n}}{s_r}. \qquad (2.2a)$$

Якщо, наприклад, при $P = 95$ % і $v = n - 1$ реалізується нерівність

$$t > t(P, v), \qquad (2.3)$$

то одержані за даною методикою результати обтяжені статистично значущою систематичною похибкою на довірчому рівні P, відносна величина якої δ може бути оцінена за формулою:

$$\delta = \left|1 - \frac{\overline{x}}{\mu}\right| \times 100\ \%. \qquad (2.4)$$

Значущі систематичні похибки (тобто похибки, для яких реалізується нерівність (2.3)) мають бути обов'язково перевірені на практичну значущість (див. нижче) для рязвязання поставленої задачі.

Приклад обчислень наведений у розділі 8.5.

При проведенні спільної статистичної обробки декількох вибірок, дані в стовпчиках 1–4, 7–9 Табл. 2.1 наводять окремо для кожної вибірки. При цьому у стовпчиках 2, 4, 6–9 в останньому рядку під рискою наводять узагальнені значення ν, s, t, Δ_x, ε і δ. Аналогічно для Табл. 2.1а.

Якщо для обчислення метрологічних характеристик методики використовуються дані аналітичного архіву, значення μ невідоме і, відповідно, заповнюються не усі стовпчики Табл. 2.1.

2.4.2. Практична значущість систематичної похибки

Поняття практичної значущості систематичної похибки ґрунтується на принципі незначущості.

2.4.2.1. Принцип незначущості

Довірчий інтервал Δ_2 є значущим на рівні P % (незначущим на рівні 100 − P %) порівнюючи з довірчим інтервалом Δ_1, якщо сумарний довірчий інтервал Δ_{pooled} перевищує Δ_1 не більше ніж на P %, тобто виконується нерівність:

$$\Delta_{pooled} = \sqrt{\Delta_1^2 + \Delta_2^2} \le (1 + \frac{P}{100}) \times \Delta_1. \qquad (2.5)$$

У принципі, можна задаватися будь-яким рівнем значущості P. В аналітичній практиці зазвичай використовують рівень значущості P = 5 % (тобто рівень незначущості 95 %). У цьому випадку рішенням співвідношення (2.5) буде нерівність:

$$\Delta_2 \le 0.32 \times \Delta_1. \qquad (2.6)$$

Ця нерівність є основним співвідношенням принципу незначущості при формуванні критеріїв прийнятності валідаційних характеристик (див. *5.3.N.2* «*Валідація аналітичних методик і випробувань*»).

Відзначимо, що для рівня значущості P = 1 % (тобто рівня незначущості 99 %) коефіцієнт перед Δ_1 в рівнянні (2.6) буде не 0.32, а 0.14, а для рівня значущості 10 % (тобто рівня незначущості 90 %) — 0.46.

2.4.2.2. Критерій практичної незначущості систематичної похибки

Систематична похибка δ є практично незначущою для розвязання поставленої аналітичної задачі, якщо виконується нерівність:

$$\delta \le 0.32 \times max\Delta_{As}. \qquad (2.7)$$

Тут: $max\Delta_{As}$ — максимально допустима невизначеність результатів аналізу, виражена як довірчий інтервал для рівня значущості P = 5 % (див. розділ *D* загальної статті *5.3.N.2.* «*Валідація аналітичних методик і випробувань*».

Використання критерію (2.7) практичної незначущості систематичної похибки вільне від тих недоліків, які має застосування принципу статистичної незначущості (2.1) — див. вище.

Приклад оцінювання статистичної і практичної значущості систематичної похибки наведений у розділі 8.5.

3. ПОРІВНЯННЯ ДВОХ МЕТОДИК АНАЛІЗУ ЗА ВІДТВОРЮВАНІСТЮ

Таке порівняння проводять шляхом з'ясування значущості розходження вибіркових дисперсій аналізу цих двох методик. У більш загальному випадку даний підхід застосовується для оцінки значущості розходження двох вибіркових дисперсій — наприклад, з метою з'ясувати, чи можна їх вважати вибірковими оцінками однієї і тієї самої дисперсії генеральної сукупності.

При порівнянні відтворюваності (збіжності) двох методик аналізу з оцінками дисперсій s_1^2 і s_2^2 ($s_1^2 > s_2^2$) обчислюють критерій Фішера F:

$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2}. \qquad (3.1)$$

Критерій F характеризує при $s_1^2 > s_2^2$ вірогідність розходження між s_1^2 і s_2^2.

Обчислене значення F порівнюють із табличним значенням $F(\overline{P}, \nu_1, \nu_2)$, знайденим при $\overline{P}$ = 99 % (див. Табл. 10.5 Додатка).

Якщо

$$F > F(P_1, \nu_1, \nu_2), \qquad (3.2)$$

розходження дисперсій s_1^2 і s_2^2 визнається статистично значущим з імовірністю $\overline{P}$, що дозволяє

зробити висновок про більш високу відтворюваність другої методики. При

$$F \le F(P_1, v_1, v_2) \qquad (3.3)$$

розходження значень s_1^2 і s_2^2 не може бути визнане значущим, і висновок про розходження відтворюваності (збіжності) методик не можна зробити через недостатній обсяг інформації. Якщо

$$F(P_1 = 0.95\ \%, v_1, v_2) < F < \\ < F(P_1 = 0.99\ \%, v_1, v_2), \qquad (3.4)$$

доцільно провести подальші експериментальні дослідження для методики із кращою відтворюваністю.

При порівнянні двох методик аналізу результати статистичної обробки можуть бути подані у вигляді Табл. 3.1. Порівняння бажано проводити при $\mu_1 = \mu_2$, $v_1 > 10$ і $v_2 > 10$. Якщо точні значення μ_1 і μ_2 невідомі, величини δ і $t_{обч}$ не визначають.

Якщо при вимірюваннях одержують логарифми вихідних варіант, замість величин μ, $\overline{x}$ і s в Табл. 3.1 наводять величини $lg\mu$, $\lg \overline{x}_g$ і $s_{\lg}$. При цьому в стовпчик 8 вносять величину Δ_{lgx}, а у 9 — максимальне за абсолютною величиною значення ε. Аналогічні заміни проводять при обчисленні t за рівнянням (2.3) і F за рівнянням (3.1).

Приклад обчислень наведений у розділі 8.5.

4. МЕТРОЛОГІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА СЕРЕДНЬОГО РЕЗУЛЬТАТУ

Якщо за допомогою даної методики аналізу (вимірювання) треба визначити значення певної характеристики (показника якості лікарського засобу) A, для одержаної експериментально однорідної вибірки обсягом m розраховують величини, необхідні для заповнення Табл. 4.1. Якщо методика має метрологічну атестацію, стовпчики 2, 4, 5, 7, 8 і 9 Табл. 4.1 заповнюються на підставі даних Табл. 2.1. Це дозволяє значно звузити межі довірчого інтервалу за рахунок більшого числа ступенів свободи (див. рівняння (1.24)). Якщо $n \le 15$, а $\frac{m+n}{n} > 1.5$, величини s і v доцільно обчислювати за формулами (1.14) і (1.15).

У багатьох випадках простіше використовувати відносні (щодо $\overline{x}$) величини. У цьому разі доцільно проводити розрахунки за Табл. 4.1а.

Таким чином, на підставі виразу (1.20) для вимірюваної величини A за незначущості систематичної похибки з імовірністю P виконується умова:

$$\overline{x} - \Delta\overline{x} \le A \le \overline{x} + \Delta\overline{x}, \qquad (4.1)$$

тобто

Таблиця 3.1

Дані для порівняльної метрологічної оцінки двох методик аналізу

Методика; № п/п	μ	v	$\overline{x}$	s	P	$t(P, v)$	Δ_x	ε	$t_{обч}$	$F(P, v_1, v_2)$ (табл) P = 99 %	$F_{обч}$	δ	**Примітки**
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1 2													

Таблиця 4.1

Метрологічні характеристики середнього результату

m	v	$\overline{x}$	s	$s_{\overline{x}}$	P	$t(P, v)$	Δ_x	$\Delta_{\overline{x}}$ **або** $\overline{x} \pm \Delta_{\overline{x}}$	$\overline{\varepsilon}$
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

Таблиця 4.1а

Метрологічні характеристики середнього результату

m	v	$\overline{x}$	s	s_r	$s_{\overline{x},r}$	P	$t(P,v)$	$\Delta_{\overline{x},r}$	$\overline{\varepsilon}$
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

$$A = \overline{x} \pm \Delta\overline{x}, \qquad (4.2)$$

або з використанням відносних величин:

$$\frac{A}{\overline{x}} = 1 \pm \Delta_{\overline{x},r.} \qquad (4.2а)$$

Якщо при вимірюваннях одержують логарифми вихідних варіант, у стовпчику 9 Табл. 4.1 наводять величину $\Delta_{lg\overline{x}}$, а кожний зі 3, 9 і 10 розбивають на два (а, б). У 3а наводять значення $\overline{x}_g$, у 3б — значення $\lg\overline{x}_g$, у 9а і 9б — відповідне значення нижньої та верхньої меж довірчого інтервалу для $\overline{x}_g$ (див. рівняння 1.31 і 1.32). Нарешті, у стовпчику 10 наводять максимальне за абсолютною величиною значення ε (див. рівняння (1.35а)).

5. ПОРІВНЯННЯ СЕРЕДНІХ РЕЗУЛЬТАТІВ ДВОХ ВИБІРОК

Якщо в результаті вимірювань однієї і тієї самої характеристики (показника якості лікарського засобу) A одержані дві вибірки обсягом n_1 і n_2, причому $\overline{x}_1 \neq \overline{x}_2$, може виникнути необхідність перевірки статистичної вірогідності гіпотези:

$$\overline{x}_1 = \overline{x}_2, \qquad (5.1)$$

тобто значущості різниці $(\overline{x}_1 - \overline{x}_2)$.

Така перевірка необхідна, якщо величина A визначалася за двома різними методиками з метою їхнього порівняння, або якщо величина A визначалася за тією самою методикою для двох різних об'єктів, ідентичність яких слід довести. Для перевірки гіпотези (5.1) треба на першому етапі встановити, чи існує статистично значуще розходження між дисперсіями s_1^2 і s_2^2. Ця перевірка проводиться, як зазначено в розділі 3.

Розглянемо різні випадки.

5.1. Розходження дисперсій s_1^2 і s_2^2 статистично незначуще (справедлива нерівність (3.3)). У цьому разі значення s_p^2 обчислюють за рівнянням (1.14), а дисперсію s_d^2 різниці $|\overline{x}_1 - \overline{x}_2|$ — за рівнянням (5.2):

$$s_d^2 = \frac{s_p^2 \times (n_1 + n_2)}{n_1 \times n_2} \qquad (5.2)$$

$$s_d = \sqrt{s_d^2}\,. \qquad (5.3)$$

Далі обчислюють критерій Стьюдента:

$$t = \frac{|\overline{x}_1 - \overline{x}_2|}{s_d} = \frac{|\overline{x}_1 - \overline{x}_2|}{s_P} \times \sqrt{\frac{n_1 \times n_2}{n_1 + n_2}}\,, \qquad (5.4)$$

$$\nu = n_1 + n_2 - 2. \qquad (5.5)$$

Якщо при обраному значенні P_2 (наприклад, при $P_2 = 95\,\%$)

$$t > t(P_2, \nu), \qquad (5.6)$$

результат перевірки позитивний — різниця ($\overline{x}_1 - \overline{x}_2$) є значущою, і гіпотезу $\overline{x}_1 \neq \overline{x}_2$ відкидають. Якщо ні, слід визнати, що ця гіпотеза не суперечить експериментальним даним.

5.2. Розходження значень s_1^2 і s_2^2 статистично значуще (справедлива нерівність (3.2). Якщо $s_1^2 > s_2^2$, дисперсію s_p^2 різниці $(\overline{x}_1 - \overline{x}_2)$ знаходять за рівнянням (5.7), а число ступенів свободи ν' — за рівнянням (5.8):

$$s_d^2 = \frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}, \qquad (5.7)$$

$$\nu' = (n_1 + n_2 - 2) \times \left(0.5 + \frac{s_1^2 \times s_2^2}{s_1^4 + s_2^4}\right). \qquad (5.8)$$

Отже, у цьому разі:

$$t = \frac{|\overline{x}_2 - \overline{x}_2|}{s_d} = |\overline{x}_1 - \overline{x}_2| \times \sqrt{\frac{n_1 \times n_2}{n_2 \times s_1^2 + n_1 \times s_2^2}}\,. \qquad (5.9)$$

Обчислене за рівнянням (5.9) значення t порівнюють із табличним значенням $t(P_2, \nu')$, як це описано вище для випадку 1.

Розгляд проблеми спрощується, коли $n_1 \approx n_2$ і $s_1^2 >> s_2^2$. Тоді за відсутности систематичної похибки середнє $\overline{x}_2$ вибірки об'єму n_2 беруть за досить точну оцінку величини A, тобто $\overline{x}_2 = \mu$. Справедливість гіпотези $\overline{x}_1 = \mu$, еквівалентної гіпотезі (5.1), перевіряють за допомогою виразів (2.2) і (2.3), беручи $\nu_1 = n_1 - 1$. Гіпотеза (5.1) відхиляється як статистично вірогідна, якщо виконується нерівність (2.3).

5.3. Відоме точне значення величини A. Якщо $A = \mu$, перевіряють дві гіпотези: $\overline{x}_1 = \mu$ і $\overline{x}_2 = \mu$. Перевірку виконують так, як описано в розділі 2 за допомогою виразів (2.2) і (2.3), окремо для кожної з гіпотез. Якщо обидві гіпотези, що перевіряються, статистично вірогідні, слід визнати вірогідною і гіпотезу (5.1). А якщо ні, гіпотеза (5.1) має бути відкинута.

Якщо при вимірюваннях одержують логарифми вихідних варіант, при порівнянні середніх використовують величини $\lg\overline{x}_g$, $s_{\lg}^2$ і $s_{\lg}$.

Якщо різниця $(\overline{x}_1 - \overline{x}_2)$ виявляється значущою, визначають довірчий інтервал для різниці відповідних генеральних середніх $(\hat{x}_1 - \hat{x}_2)$

$$|\bar{x}_1 - \bar{x}_2| - t(P_2, v) \times s_d \le |\hat{x}_1 - \hat{x}_2| \le |\bar{x}_1 - \bar{x}_2| + t(P_2, v) \times s_d . \quad (5.10)$$

5.4. Використання довірчих інтервалів. Даний випадок досить часто зустрічається на практиці (див. п. 8.6.2).

Нехай за результатами експерименту отримані дві випадкові величини x_1 і x_2 (одиничні або середні), які характеризуються довірчими інтервалами Δ_1 і Δ_2 (с якоюсь довірчою вірогідністю p, зазвичай $p = 0.95$). Чи є різниця між величинами x_1 і x_2 статистично значущою на тому ж рівні значущості p?

Відповідно до співвідношення (9.5), знаходимо об'єднаний довірчий інтервал Δ_P:

$$\Delta_P = \sqrt{\Delta_1^2 + \Delta_2^2} . \quad (5.11)$$

Різниця між величинами x_1 і x_2 є статистично незначущою на рівні вірогідності p, якщо виконується співвідношення:

$$x_2 - x_1 \le \Delta_P . \quad (5.12)$$

Усі методики контролю якості лікарських засобів мають бути валідовані (див. *5.3.N.2 «Валідація аналітичних методик і випробувань»*). При проведенні валідації методик кількісного визначення лікарських засобів не ставлять за мету встановити невизначеність методики (вона може значно відрізнятися в різних лабораторіях, наприклад, з різним рівнем обладнання), а доводять, що ця невизначеність не перевищує максимально допустимої величини $max\Delta_{As}$, яка визначається фармакопейним допуском вмісту (див. *5.3.N.2 «Валідація аналітичних методик і випробувань»*). Тому при з'ясуванні статистичної значущості відмінності результатів, отриманих в різних серіях експериментів (наприклад, в різних лабораторіях), у співвідношенні (5.11) покладають $\Delta_1 = \Delta_2 = max\Delta_{As}$. Вираз (5.12) набуває при цьому вигляду:

$$|x_2 - x_1| \le \sqrt{2} \times \max \Delta_{As} . \quad (5.13)$$

Приклади розрахунків наведені в розділі 8.6.

6. ІНТЕРПРЕТАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ АНАЛІЗУ

Інтерпретація результатів аналізу відрізняється для метрологічно атестованої методики і методики, яка валідована згідно з рекомендаціями загальної статті *5.3.N.2 «Валідація аналітичних методик і випробувань»*.

Інтерпретація для метрологічно атестованої методики ґрунтується на тому, що для неї відома прийнята оцінка стандартного відхилення (RSD_{As}). Такий випадок зустрічається, наприклад, при рутинному аналізі в конкретній лабораторії підприємства. Використання даної оцінки стандартного відхилення зазвичай можливо застосовувати тільки в межах цієї лабораторії, оскільки стандартні відхилення RSD_{As} в різних лабораторіях можуть значно варіюватися. Відзначимо, що і в однієї лабораторії фактичне значення стандартного відхилення може значно варіюватися, наприклад, для різного обладнання, для різних аналітиків, змінюватися з часом тощо. Тому лабораторія має докладати певних зусиль для підтвердження, що фактичне значення стандартного відхилення не перевищує зробленої оцінки.

Інтерпретація результатів для валідованої методики ґрунтується на тому, що для неї відома максимально допустима повна невизначеність аналізу $max\Delta_{As}$. Для демонстрації коректності результатів аналізу всі лабораторії мають контролювати, щоб фактичне значення Δ_{As} не перевищувало $max\Delta_{As}$. Оскільки величина $max\Delta_{As}$ є однаковою для всіх контрольних лабораторій, то отримані висновки є коректними також і для них. Тому цей підхід значно більше застосовується у фармацевтичному аналізі.

6.1. ОЦІНКА ЗБІЖНОСТІ РЕЗУЛЬТАТІВ ПАРАЛЕЛЬНИХ ВИПРОБУВАНЬ

При рутинних аналізах зазвичай проводиться два-три, рідше чотири-шість паралельних визначення. Варіанти одержаної при цьому вибірки обсягом n, упорядкованої згідно з (1.1), можуть значно відрізнятися один від одного. Якщо для даної методики відома (наприклад, за даними попередніх досліджень) прийнята оцінка стандартного відхилення s, то максимальна різниця результатів двох рівнобіжних визначень має задовольняти нерівність:

$$|x_1 - x_n| < L(P, n) \times s, \quad (6.1)$$

де $L(P, n)$ — фактор, обчислений за Пірсоном при $P = 95\ \%$.

Таблиця 6.1

Значення фактора L(95 %, n) для різного обсягу вибірки

n	2	3	4
L	2.77	3.31	3.65

Якщо нерівність (6.1) не виконується, слід провести додаткове визначення і знову перевірити, чи задовольняє величина $|x_1 - x_n|$ нерівність (6.1).

Якщо за результатами чотирьох рівнобіжних визначень нерівність (6.1) не виконується, вважають, що конкретні умови аналізу призвели до зниження відтворюваності методики і прийнята оцінка величини *s* стосовно даного випадку є заниженою. У цьому разі визначення проводять, як зазначено в розділі 1.2.

6.2. ЗАБЕЗПЕЧЕННЯ ЯКОСТІ РЕЗУЛЬТАТІВ

Проблема забезпечення якості отриманих результатів виникає завжди — як при рутинному аналізі, так і в лабораторних дослідженнях. Підходи, які при цьому використовуються, зазвичай спираються на максимально допустимі значення невизначеності результатів.

6.2.1. Кваліфікація мірного посуду

Мірний посуд, який використовується в контрольних лабораторіях, має відповідати вимогам нормативних документів. Ці документи встановлюють максимально допустиме відхилення (зазвичай це вимоги ISO — $max\Delta_{ISO}$) фактичного об'єму від номінального (задекларованого). При надходженні мірного посуду в контрольну лабораторію (а також періодично в процесі роботи) він підлягає перевірці на відповідність максимально допустимому відхиленню.

Методика проведення верифікації не має значуще впливати на визначення фактичного об'єму, тобто її невизначеність Δ_{verif} має бути незначущою (див. (2.6)) порівнюючи з $max\Delta_{ISO}$:

$$\Delta_{verif} \le max\Delta_{verif} = 0.32 \times max\Delta_{ISO}. \quad (6.2)$$

Значення Δ_{verif} при цьому розраховується зі стандартного відхилення верифікації s_{verif} за рівнянням (v — число ступенів свободи):

$$\Delta_{verif} = \frac{s_{verif} \times t(95\ \%, v)}{\sqrt{n}}. \quad (6.3)$$

Приклад проведення перевірки мірного посуду наведений у розділі 8.7.1.

6.2.2. Придатність хроматографічної системи

При проведенні контролю якості лікарських засобів, особливо хроматографічними методами, необхідно провести підтвердження придатності системи. При цьому, зокрема, виникає необхідність визначення максимально допустимого відносного стандартного відхилення RSD_{max} і необхідного числа паралельних випробувань n для даних допусків вмісту $(100 \pm B)\%$ речовини, що аналізується.

У випадку хроматографічних методів невизначеність пробопідготовки є зазвичай незначущою порівнюючи з максимально допустимою загальною невизначеністю аналізу $max\Delta_{As}$. Якщо валідація довела, що інші значущі джерела невізначеності (відхилення від лінійності, стабільність тощо) відсутні, то максимально допустима невизначеність кінцевої операції ($max\Delta_{FAO}$) співпадає з $max\Delta_{As}$. Якщо кількісне визначення проводиться методом стандарту, то $max\Delta_{FAO}$ (у випадку хроматографії це невизначеність паралельних вимірювань площ чи висот піків або їхніх відношень стандартного розчину і розчину, що аналізується) знаходиться за рівнянням (див. (9.8)):

$$\max \Delta_{As} = \max \Delta_{FAO} = \sqrt{2} \times \frac{RSD_{\max} \times t(95\ \%, n-1)}{\sqrt{n}}. \quad (6.4)$$

Звідси отримаємо вимоги до максимально допустимого значення відносного стандартного відхилення (RSD_{max}) як функції $max\Delta_{As}$ і числа паралельних хроматограм n:

$$RSD_{\max} = \frac{\max \Delta_{As} \times \sqrt{n}}{\sqrt{2} \times t(95\ \%, n-1)}. \quad (6.5)$$

Розраховані за цим рівнянням значення RSD_{max} для різних n і $max\Delta_{As}$ наведені в загальній статті *2.2.46 «Методи хроматографічного розділення»*.

6.3. ГАРАНТІЯ ЯКОСТІ ПРОДУКЦІЇ

6.3.1. Метрологічно атестована методика

Припустимо, що якість продукції регламентується граничними значеннями a_{min} і a_{max} величини A, що визначають за результатами аналізу. Для отримання загальних співвідношень зручніше перейти до нормалізованих координат (див. п. 2.2 статті *5.3.N.2 «Валідація аналітичних методик і випробувань»*), тобто до відносних величин — у відсотках до номінальної величини $A_{ном}$. Тоді $X = 100 \times (A/A_{ном})$, $100 - B_{Low} = 100 \times (a_{min}/A_{ном})$, $100 + B_{High} = 100 \times (a_{max}/A_{ном})$.

Покладемо, що ймовірність відповідності якості продукції умові:

$$100 - B_{Low} \le X \le 100 + B_{High} \quad (6.6)$$

має становити $P_1\ \%$.

Нехай величину X знаходять експериментально як середнє вибірки обсягом n, а методика її ви-

значення метрологічно атестована (тобто відоме RSD_{As}). Тоді умова (6.6) буде виконуватися з імовірністю P_1, якщо значення $\bar{x} = X$ буде знаходитися в межах:

$$100 - B_{Low} + \Delta_X \le X < 100 + B_{High} - \Delta_X, \quad (6.7)$$

де

$$\Delta_X = \frac{U(P_1) \times RSD_{As}}{\sqrt{n}}. \quad (6.8)$$

Значення коефіцієнта U для ймовірності $P_1 =$ 95 % і $P_1 = 99$ % відповідно дорівнюють 1.65 і 2.33.

Для гарантії якості спостережувані межі змін величини X на практиці слід обмежити значеннями:

$$X_{\min} = 100 - B_{Low} + \Delta_X = 100 - B_{Low} + \frac{U(P_1) \times RSD_{As}}{\sqrt{n}}, \quad (6.9)$$

$$X_{\max} = 100 + B_{High} - \Delta_X = 100 + B_{High} - \frac{U(P_1) \times RSD_{As}}{\sqrt{n}}. \quad (6.10)$$

Навпаки, якщо задані значення X_{min} і X_{max}, то значення B_{Low} і B_{High}, що входять до нерівності (6.5), можуть бути знайдені шляхом розв'язування рівнянь (6.9) і (6.10). Нарешті, якщо задані пари значень X_{min}, B_{Low} і X_{max}, B_{High}, рівняння (6.9) і (6.10) можуть бути розв'язані відносно n. Це може бути використане для оцінки необхідного числа паралельних випробувань величини X.

Якщо при вимірюваннях одержують логарифми вихідних варіант, описані в розділі 6 обчислення проводять із використанням величин $\lg \bar{x}_g$, $\lg x_i$, $s_{\lg}$ та ін.

Приклади розрахунків наведені в розділі 8.8.1.

Слід відзначити, що такий підхід досить рідко застосовний при контролі якості лікарських засобів, бо провести метрологічну атестацію методики, як правило, можливо тільки в межах однієї лабораторії або підприємства (див. вище). Відповідно, гарантуючі допуски (6.5–6.8) мають сенс тільки в межах даної лабораторії або підприємства, що не дозволяє гарантувати отримання позитивних результатів аналізу в інших лабораторіях (наприклад, в державних контрольних лабораторіях). Більш коректним є підхід, оснований на використанні максимально допустимої повної невизначеності аналітичної методики $max\Delta_{As}$, яка зазвичай встановлюється з інших міркувань, ніж фактичні метрологічні характеристики методики, та підтверджується для методики при її валідації (див. *5.3.N.2* «*Валідація аналітичних методик і випробувань*»).

6.3.2. Валідована методика

При валідації методики підтверджується, зокрема, максимально допустима повна невизначеність аналізу $max\Delta_{As}$. У процесі валідації робиться прогноз, що при виконанні фармакопейних та інших вимог у інших лабораторіях з високою надійністю також будуть виконуватися вимоги до $max\Delta_{As}$. Ця величина є однаковою для всіх лабораторій. Тому для гарантування отримання позитивних результатів аналізу в інших лабораторіях рівняння (6.7) набуває такого вигляду:

$$100 - B_{Low} + \max\Delta_{As} \le X \le 100 + B_{High} - \max\Delta_{As}. \quad (6.11)$$

Значення $max\Delta_{As}$ для різних допусків вмісту в субстанціях і готових лікарських засобах, а також способи її розрахунку наведені в статті *5.3.N.2* «*Валідація аналітичних методик і випробувань*» *(Таблиця 3)*.

Приклади розрахунків наведені в розділі 8.8.2.

6.3.3. Урахування факторів неоднорідності для дозованих одиниць

Гарантуючі допуски, наведені у п. 6.3.1–6.3.2, застосовні тільки для однорідних лікарських засобів (зокрема, розчинів, ін'єкцій тощо), бо враховують тільки невизначеність аналітичної методики. У випадку дозованих одиниць (таблеток, капсул, супозиторіїв тощо) визначальним чинником є не невизначеність аналітичної методики, а технологічні фактори — неоднорідність дозованих одиниць (див. п. 2.3.1), яка регламентується вимогами статті *2.9.40* «*Однорідність дозованих одиниць*».

Згідно з вимогами цієї статті, відносний довірчий інтервал неоднорідності вмісту діючої речовини в окремих дозованих одиницях (Δ_{unif}) не має перевищувати $L1 = 15$ %. Кількісне визначення для таблеток зазвичай проводиться з порошку 20 розтертих таблеток з перерахунком на середню масу однієї таблетки. Якщо для аналізу береться наважка порошку, близька до маси однієї таблетки, то статистично незначуща різниця в результатах аналізу між двома паралельними наважками, тільки за рахунок неоднорідності, не має перевищувати $\sqrt{2} \times 15/\sqrt{20} = 4.7$ % (див. рівняння (1.23) і (5.13)). Сюди ще треба додати невизначеність аналітичної методики.

Беручи до уваги наведене, за результатами аналізу декількох наважок важко з достатньою точністю визначити генеральне середнє вмісту речовини, що аналізується, що ускладнює встановлення гарантуючих допусків.

Встановлення гарантуючих допусків, яке розглядається нижче, є поєднанням підходів, які описані у п. 6.3.1 і 6.3.2, і застосовне тільки для валідованої технології виробництва дозованого лікарського засобу.

Якщо технологія валідована, то відоме генеральне значення вмісту діючої речовини у відсотках до номінального вмісту (X_0) і генеральне стандартне відхилення неоднорідності вмісту (RSD_{unif}). Ці величини, на відміну від RSD_{As} (п. 6.3.1), є технологічними і тому однаковими для всіх лабораторій, що дає можливість використовувати їх для отримання гарантуючих допусків.

Беручи це до уваги, отримаємо гарантуючі допуски вмісту діючої речовини при кількісному визначенні з наважки (близької до маси однієї таблетки) порошку n таблеток з перерахунком на середню масу однієї таблетки:

$$X_0 - \frac{\Delta_{unif}}{\sqrt{n}} - \max \Delta_{As} \le X \le \\ \le X_0 + \frac{\Delta_{unif}}{\sqrt{n}} + \max \Delta_{As}. \quad (6.12)$$

Зазвичай для кількісного визначення використовується порошок $n = 20$ таблеток. Тоді для ймовірності $P_1 = 95\ \%$ маємо:

$$\frac{\Delta_{unif}}{\sqrt{20}} = \frac{1.65 \times RSD_{unif}}{\sqrt{20}} = 0.37 \times RSD_{unif}. \quad (6.13)$$

Відповідно, гарантуючі допуски (6.12) набувають вигляду:

$$X_0 - 0.37 \times RSD_{unif} - max\Delta_{As} \le X \le \\ \le X_0 + 0.37 \times RSD_{unif} + max\Delta_{As}. \quad (6.14)$$

Приклади розрахунків наведені в розділі 8.8.3.

Загальне співвідношення (6.12) дозволяє отримати граничні значення допусків вмісту діючої речовини для дозованих готових лікарських засобів.

Згідно з вимогами статті *2.9.40 «Однорідність дозованих одиниць»*, максимальне допустиме значення відносного довірчого інтервалу неоднорідності вмісту діючої речовини в окремих дозованих одиницях ($max\Delta_{unif}$) дорівнює $L1$. Покладаючи також для генерального середнього $X_0 = 100\ \%$, із співвідношення (6.12) отримаємо:

$$100 - \frac{L1}{\sqrt{n}} - \max \Delta_{As} \le X \le \\ \le 100 + \frac{L1}{\sqrt{n}} + \max \Delta_{As}. \quad (6.15)$$

6.4. ОЦІНКА РЕЗУЛЬТАТІВ ТЕСТУВАННЯ

Така необхідність виникає, наприклад, при оцінці результатів: внутрішнього лабораторного тестування співробітників, міжлабораторного експерименту в межах однієї компанії, а також при проведенні зовнішнього тестування лабораторій. Характерні особливості такого оцінювання:

1. Невизначеність результатів невідома і може дуже (у декілька разів) відрізнятися. Тобто, у загальному випадку, ці результати не можна апріорно вважати статистично еквівалентними.
2. Кількість результатів (тобто обсяг вибірки) є принципово обмеженою і не може бути збільшена для покращення метрологічних характеристик.
3. Результати аналізу можуть мати загальний зсув (додатний або від'ємний) щодо генерального середнього (яке може бути невідомим).

При цьому зазвичай зустрічаються дві основні аналітичні задачі.

6.4.1. Розрахунок метрологічних характеристик міжлабораторної вибірки

Варіанти, що випадають, спотворюють ці характеристики і мають бути вилучені перед розрахунком цих характеристик. Процедура їх вилучення у цьому випадку має суто статистичний характер і нічим не відрізняється від описаної у розділах 1.2.1–1.2.2. Приклад вилучення варіант, що випадають, при оцінці результатів зовнішнього тестування наведений у розділі 8.9.2.

6.4.2. Оцінка якості результатів учасників тестування

За аналогією з (1.3) для оцінки результатів зазвичай використовують відхилення ($bias_i$) результатів учасників (X_i) від приписного значення X_{Assign}:

$$bias_i = |X_i - X_{Assign}|. \quad (6.16)$$

Цим приписним значенням X_{Assign} може бути атестоване організаторами значення випробовуваної характеристики, середнє значення результатів, отриманих учасниками тощо. Відхилення результатів учасників $bias_i$ не має перевищувати величини *maxbias*, встановленої організаторами, тобто:

$$bias_i \le \max bias. \quad (6.17)$$

При цьому загальна невизначеність Δ_{Assign} приписного значення має бути незначущою порівнюючи з *maxbias*, тобто згідно з (2.6):

$$\Delta_{Assign} \le 0.32 \times \max bias. \quad (6.18)$$

Зазвичай учасники тестування, результати яких не відповідають співвідношенню (6.17), вважаються такими, що не пройшли тестування.

Характерною особливістю підходів, що ґрунтуються на співвідношенні (6.17), є те, що величина *maxbias* може встановлюватися не тільки зі статистичних, але й з інших міркувань.

6.4.3. Внутрішньолабораторне тестування

Для цього випадку характерні невеликі вибірки, які зустрічаються при атестації співробітників, а також у деяких випадках зовнішнього тестування. Невеликий обсяг вибірки не дає можливості залучити метрологічні характеристики самої вибірки. Тому використовують інші міркування.

Зокрема, як *maxbias* доцільно вибрати максимальну допустиму (з погляду організаторів) невизначеність $max\Delta$ методики аналізу, що використовується для тестування. Як $max\Delta$ також може використовуватися значення, яке є типовим для загальної аналітичної практики, або значення, яке є типовим для даної лабораторії. Якщо для тестування використовується методика специфікації, то $max\Delta$ не має перевищувати (хоча може бути і значно нижче) $max\Delta_{As}$, яка підтверджується на стадії валідації методики, тобто результати учасників мають відповідати нерівностям

$$bias_i \le \max bias = \max\Delta \le \max\Delta_{As}. \quad (6.19)$$

У деяких випадках метою тестування є оцінка збіжності результатів кожного учасника тестування. Для цього доцільно використовувати результати верифікації мірного посуду, зокрема піпеток. Фактичний довірчий інтервал верифікації учасника тестування не має перевищувати максимальне допустиме значення, тобто відповідати вимогам співвідношення (6.2).

Приклад застосування критерію (6.2) при внутрішньолабораторному тестуванні наведений у розділі 8.9.1.

6.4.4. Зовнішнє тестування

Для зовнішнього (міжлабораторного) тестування характерні великі вибірки, що дає можливість для оцінки результатів учасників залучити також метрологічні характеристики самої вибірки. При цьому зазвичай застосовуються два основних підходи: використання метрологічних характеристик вибірки результатів учасників і використання максимально допустимої невизначеності методики аналізу.

6.4.4.1. Використання метрологічних характеристик вибірки результатів учасників

Знаходять середнє значення $X_{Assign} = \bar{X}$ і відносне стандартне відхилення *RSD*.

Результати учасників, які відповідають нерівності

$$bias_i \le 2 \times RSD, \quad (6.20)$$

вважаються коректними.

Результати учасників, які відповідають нерівності

$$bias_i > 3 \times RSD, \quad (6.21)$$

вважаються некоректними.

Результати учасників, які відповідають нерівності

$$2 \times RSD < bias_i \le 3 \times RSD, \quad (6.22)$$

вважаються сумнівними.

Переваги:
— підхід не вимагає атестації тестових зразків.

Недоліки:
— залежність оцінки кожного учасника від результатів інших учасників (чим гірше результати інших учасників, тим краще результат конкретного учасника);
— відсутність зв'язку зі специфікаціями і рутинною процедурою прийняття рішень про якість лікарських засобів у контрольних лабораторіях;
— відсутність зв'язку зі здатністю конкретної лабораторії зробити висновок про якість лікарського засобу, що аналізується;

— вразливість до можливої систематичної похибки (зсуву) результатів усіх учасників.

Одним зі шляхів пом'якшення системних недоліків цього підходу є використання замість фактичних *RSD* вибірки величин, отриманих з інших міркувань, наприклад з вимог загальної аналітичної практики або архівних даних.

6.4.4.2. Використання максимально допустимої невизначеності методики аналізу

Цей підхід широко використовується при зовнішньому тестуванні лабораторій контролю якості лікарських засобів в Україні і поєднує в собі підходи розділів 6.4.2. для внутрішньолабораторного тестування і 6.4.4.1 (залучення метрологічних характеристик вибірки результатів учасників).

Переваги:
— тісний зв'язок зі специфікаціями і рутинною процедурою прийняття рішень про якість лікарських засобів у контрольних лабораторіях;
— можливість оцінити здатність конкретної лабораторії зробити висновок про якість лікарського засобу, що аналізується, і незалежність від фактичного рівня інших лабораторій;
— можливість одночасної оцінки результатів учасників на різних рівнях вимог (наприклад, здатність лабораторії коректно аналізувати лікарські засоби з межами вмісту ± 5 %, або ± 7.5 %, або ± 10 % тощо);
— стійкість до можливих систематичних похибок усіх учасників;
— можливість оцінити якість результатів учасників у цілому.

Недоліки:
— необхідність надійної атестації тестового зразка, що викликає певні труднощі для дозованих форм.

Організатори проводять атестацію тестового зразку (як такий зазвичай використовують промислову серію реального лікарського засобу) і знаходять атестоване значення X_{Attest}. Для оцінки результатів учасників застосовують співвідношення (6.16, 6.19), зазвичай покладаючи $X_{Assign} = X_{Attest}$.

Результати учасників, які відповідають вимогам (6.19), вважаються коректними, усі інші — некоректними.

При цьому невизначеність атестованого значення має відповідати співвідношенню (6.18), тобто:

$$\Delta_{Attest} \le \max\Delta_{Attest} = 0.32 \times \max\Delta_{As}. \quad (6.23)$$

Велика кількість учасників дозволяє залучити метрологічні характеристики самої вибірки і оцінити якість результатів усіх учасників у цілому і розробити відповідні коригувальні дії.

При розрахунку метрологічних характеристик методики аналізу необхідно провести попереднє виключення результатів, що випадають, бо вони спотворюють ці характеристики. Для цього використовують співвідношення (1.13). Після цього знову розраховують скориговане середнє значення результатів учасників $\overline{X}(cor)$.

6.4.4.2.1. Наявність загальної систематичної похибки результатів учасників

Розраховують різницю між скоригованим середнім результатом учасників $\overline{X}(cor)$ і приписним значенням X_{Assign}. Ця різниця не має перевищувати максимальну допустиму невизначеність атестованого значення, тобто:

$$|\overline{X(cor)} - X_{Assign}| \le \max\Delta_{Assign}. \quad (6.24)$$

Якщо нерівність (6.24) не виконується, то результати учасників обтяжені значущою систематичною похибкою щодо атестованого значення. Це може бути пов'язане з некоректним виконанням методики учасниками, що потребує розробки відповідних коригувальних пропозицій для них.

Іншою причиною невиконання критерію (6.24) може бути некоректність атестованого значення X_{Attest}. Цей фактор необхідно обов'язково виключити перед прийняттям висновку про наявність загальної систематичної похибки результатів учасників.

6.4.4.2.2. Загальна характеристика якості результатів учасників

При проведенні зовнішнього тестування лабораторій контролю якості лікарських засобів важливою є інтегрована оцінка якості результатів усіх учасників. Для цього використовують біномний розподіл.

За загальноприйнятою аналітичною практикою генеральне значення частки лабораторій (p), яка не витримують вимоги тестування, не має перевищувати 0.05 (або 5 %). Використовуючи таблиці біномного розподілу для коефіцієнта довіри $P = 0.95$, знаходять критичну найбільшу кількість некоректних результатів (max_μ) для величини $p = 0.05$ при загальній кількості учасників n. Фактична кількість некоректних

результатів (μ) не має перевищувати це критичне значення, тобто:

$$\mu \le \max \mu. \qquad (6.25)$$

Якщо критерій (6.25) не виконується, то загальний рівень учасників потребує суттєвого підвищення.

Критичні значення некоректних результатів (*max*μ) для різної кількості учасників тестування (n) наведені в Табл. 6.2.

Приклад застосування підходу розділу 6.4.4.2 для оцінки результатів зовнішнього тестування наведений у розділі 8.9.2.

7. РОЗРАХУНОК І СТАТИСТИЧНА ОЦІНКА ПАРАМЕТРІВ ЛІНІЙНОЇ ЗАЛЕЖНОСТІ

При використанні багатьох хімічних і фізико-хімічних методів кількісного аналізу безпосередньому вимірюванню піддається деяка величина y, що є лінійною функцією шуканої концентрації (кількості) x визначуваної речовини або елемента. Інакше кажучи, в основі таких методів аналізу лежить існування лінійної залежності:

$$y = bx + a, \qquad (7.1)$$

де y — вимірювана величина;
x — концентрація (кількість) визначуваної речовини або елемента;
b — кутовий коефіцієнт лінійної залежності;
a — вільний член лінійної залежності.

Для використання залежності (7.1) з аналітичною метою, тобто для визначення конкретної величини x за виміряним значенням y, слід заздалегідь знайти числові значення констант b і a, тобто провести калібрування. Іноді константи функції (7.1) мають той чи інший фізичний зміст, і їхні значення мають оцінюватися з урахуванням відповідного довірчого інтервалу. Якщо калібрування проведене і значення констант a і b визначені, величину x знаходять за виміряним значенням y_i:

$$x_i = \frac{1}{b} \times y_i - \frac{a}{b}. \qquad (7.2)$$

При калібруванні величину x розглядають як аргумент, а величину y — як функцію. Наявність лінійної залежності між x і y не завжди є очевидною. Через ці причини експериментальні дані, одержані при калібруванні, у першу чергу використовують для оцінки жорсткості, тобто ступеня невипадковості лінійного зв'язку між x і y, і лише потім визначають значення констант a і b та їхні довірчі інтервали. У першому наближенні робити висновок про жорсткість лінійного зв'язку між змінними x і y можна за величиною лінійного коефіцієнта кореляції (або просто коефіцієнта кореляції) r, що обчислюють за формулою:

$$r = \frac{m \times \sum_{i=1}^{m} x_i \times y_i - \sum_{i=1}^{m} x_i \times \sum_{i=1}^{m} y_i}{\sqrt{\left[m \times \sum_{i=1}^{m} x_i^2 - (\sum_{i=1}^{m} x_i)^2 \right] \left[m \times \sum_{i=1}^{m} y_i^2 - (\sum_{i=1}^{m} y_i)^2 \right]}} \qquad (7.3)$$

виходячи з експериментальних даних.

Лінійний коефіцієнт кореляції може змінюватися від −1 до +1. Позитивні значення r вказують на збільшення, негативні — на зменшення y із збільшенням x.

Лінійний коефіцієнт кореляції r є окремим випадком загального індексу кореляції R_c, який застосовний для будь-якого числа незалежних змінних (аргументів) у рівнянні (7.1), а також для нелінійних кореляцій між залежними і незалежними змінними:

$$R_c = \sqrt{1 - \frac{s_0^2}{s_y^2}}, \qquad (7.3а)$$

де s_o — залишкове стандартне відхилення (рівняння 7.7);
s_y — стандартне відхилення величин y_i щодо середнього значення $\overline{y}$ (рівняння 7.15); розраховують із використанням рівняння (1.5).

Рівняння (7.3а), через свою простоту, наочність, а також загальність застосування для будь-яких кореляцій, зазвичай використовують замість співвідношення (7.3) у разі, якщо знак коефіцієнта кореляції не має значення. Зокрема, при проведенні валідаційних досліджень (дивіться *5.3.N.2 «Валідація аналітичних методик і випробувань»*) наводяться вимоги до коефіцієнта кореляції у формі (7.3а).

Таблиця 6.2

Критичні значення некоректних результатів (maxμ) залежно від кількості учасників (n) для коефіцієнта довіри P = 95 %

n	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60
maxμ	3.3	3.8	4.3	4.7	5.1	5.6	6.0	6.4	6.7	7.1	7.5

Слід відзначити, що в рівнянні (7.3а) залишкове стандартне відхилення s_o у загальному випадку має $v = m - k$ ступенів свободи, де k — кількість параметрів у кореляційній залежності. Зокрема, для лінійної залежності (7.1) $v = m - 2$ ступенів свободи — дивіться рівняння (7.6–7.7). У той же час, лінійний коефіцієнт кореляції (7.3) отриманий для s_o, яке має $v = m - 1$ ступенів свободи. Співвідношення між r і R_c у випадку лінійної залежності (7.1) мають вигляд:

$$|r| = \sqrt{1 - \frac{m-2}{m-1} \times (1 - R_c^2)}, \qquad (7.3b)$$

$$R_c = \sqrt{1 - \frac{m-1}{m-2} \times (1 - r^2)}. \qquad (7.3c)$$

Рівняння (7.3) дає значення r, які дещо вищі, ніж значення R_c, розраховані за рівнянням (7.3а). Ця різниця може бути помітною при малих ступенях свободи v. Так, для $R_c = 0.99$ (таке значення є досить стандартним при проведенні валідації аналітичних методик — див. *5.3.N.2*) отримаємо $r = 0.9925$ для $m = 5$ і $r = 0.9913$ для $m = 9$.

Тому доцільно користуватися більш загальним і коректним рівнянням (7.3а) для загального індексу кореляції R_c.

Чим ближче R_c або абсолютна величина $|r|$ до одиниці, тим менш випадкова спостережувана лінійна залежність між змінними x і y.

Коефіцієнт кореляції r використовується зазвичай для виявлення стахостичного взаємозв'язку між величинами, функціональна залежність між якими може бути і відсутня. Коефіцієнт кореляції є значущим, якщо його величина для даної ймовірності P і числа ступенів свободи v перевищує значення, наведені в Табл. 10.6. В іншому разі не можна говорити про існування значимих залежностей (7.1–7.2).

Значущість коефіцієнта кореляції є обов'язковою, але не достатньою умовою використання рівнянь (7.1–7.2) для вирішення конкретної аналітичної задачі (див. *5.3.N.2* «*Валідація аналітичних методик і випробувань*»). Як видно з рівняння (7.3а), коефіцієнт кореляції залежить від аналітичного діапазону (величина s_y) і залишкового стандартного відхилення s_o, критичні значення якого визначаються допусками вмісту (див. *5.3.N.2*). У фармацевтичному аналізі в більшості випадків для кількісного визначення використовують лінійні залежності з коефіцієнтом кореляції $|r| \geq 0.99$ (при відповідності вимогам Табл. 10.6) і навіть для контролю домішок — $|r| \geq 0.97$ (див. *5.3.N.2*).

Коефіцієнти a і b та інші метрологічні характеристики залежності (7.1) розраховують з використанням методу найменших квадратів за експериментально виміряними значеннями змінної y для заданих значень аргументу x. Нехай знайдені у результаті експерименту пари значень аргументу x і функції y представлені в Табл. 7.1.

Таблиця 7.1

i	x_i	y_i
1	x_1	y_1
2	x_2	y_2
...	...	...
m	x_m	y_m

Якщо величини y_i мають однакову невизначеність (а таке допущення зазвичай виконується для досить вузького діапазону варіювання величин y_i), то:

$$b = \frac{m \times \sum_{i=1}^{m} x_i \times y_i - \sum_{i=1}^{m} x_i \times \sum_{i=1}^{m} y_i}{m \times \sum_{i=1}^{m} x_i^2 - (\sum_{i=1}^{m} x_i)^2}, \qquad (7.4)$$

$$a = \frac{\sum_{i=1}^{m} y_i - b \times \sum_{i=1}^{m} x_i}{m}, \qquad (7.5)$$

$$v = m - 2. \qquad (7.6)$$

Якщо одержані значення коефіцієнтів a і b використовувати для обчислення значень y за заданими в Табл. 7.1 значеннями аргументу x згідно з залежністю (7.1), обчислені значення y позначають через Y_1, Y_2, ... Y_i, ... Y_n. Розкид значень y_i відносно значень Y_i характеризує величина залишкової дисперсії s_0^2, яку розраховують за рівнянням:

$$s_0^2 = \frac{\sum_{i=1}^{m} (y_i - Y_i)^2}{v} = \frac{\sum_{i=1}^{m} y_i^2 - a \times \sum_{i=1}^{m} y_i - b \times \sum_{i=1}^{m} x_i y_i}{v}. \qquad (7.7)$$

Для того щоб рівняння (7.1–7.2) адекватно описували експериментальні дані, необхідно, щоб залишкова дисперсія s_0^2 не відрізнялася значущо за критерієм Фішера (співвідношення (3.1–3.4)) від дисперсії відтворюваності (збіжності) величин y_i. Остання може бути знайдена експериментально або прогнозована (див. розділ 9) з паспортних даних обладнання.

У свою чергу дисперсії констант b і a розраховують за рівняннями:

$$s_b^2 = \frac{m \times s_0^2}{m \times \sum_{1}^{m} x_i^2 - (\sum_{1}^{m} x_i)^2}, \qquad (7.8)$$

$$s_a^2 = \frac{s_b^2}{m} \times \sum_1^m x_i^2 , \qquad (7.9)$$

Стандартні відхилення s_b і s_a і величини Δ_b і Δ_a, необхідні для оцінки довірчих інтервалів констант, розраховують за рівняннями:

$$s_b = \sqrt{s_b^2} , \qquad (7.10)$$

$$s_a = \sqrt{s_a^2} , \qquad (7.11)$$

$$\Delta_b = t(P_2, v) \times s_b ,$$

$$\Delta_a = t(P_2, v) \times s_a .$$

Коефіцієнти a і b мають значущо відрізнятися від нуля, тобто перевищувати відповідно величини Δ_a і Δ_b.

Рівняння (7.1) із константами a і b обов'язково задовольняє точка з координатами $\overline{x}$ і $\overline{y}$, яку називають центром калібрувальної кривої:

$$\overline{x} = \frac{\sum_1^m x_i}{m}, \qquad (7.14)$$

$$\overline{y} = \frac{\sum_1^m y_i}{m} . \qquad (7.15)$$

Найменші відхилення значень y_i від значень Y_i спостерігаються довкола центра кривої. Стандартні відхилення s_y і s_x величин y і x, розрахованих відповідно за рівняннями (7.1) і (7.2), виходячи з відомих значень x і y, визначають з урахуванням віддалення останніх від координат центра кривої:

$$s_y = \sqrt{s_0^2 \times \left[\frac{1}{m} + \frac{m \times (x - \overline{x})^2}{m \times \sum_{i=1}^m x_i^2 - (\sum_{i=1}^m x_i)^2} \right]}, \qquad (7.16)$$

$$s_x = \sqrt{\frac{s_0^2}{b^2} \times \left[\frac{1}{n_j} + \frac{1}{m} + \frac{m \times (\overline{y}_j - \overline{y})^2}{b^2 \left[m \times \sum_{i=1}^m x_i^2 - (\sum_{i=1}^m x_i)^2 \right]} \right]}, \qquad (7.17)$$

де $\overline{y}_j$ — середнє значення;
n_j — число варіант, використаних при визначенні $\overline{y}_j$.

При $x = \overline{x}$ і $\overline{y}_j = \overline{y}$:

$$s_y = \sqrt{\frac{s_0^2}{m}}, \qquad (7.16a)$$

$$s_x = \sqrt{\frac{s_0^2}{b^2} \times \left[\frac{1}{n_j} + \frac{1}{m} \right]} .$$

Із урахуванням значень s_y і s_x можуть бути знайдені значення величин Δ_y і Δ_x.

$$\Delta_y = s_y \times t(P_2, v), \qquad (7.18)$$

$$\Delta_x = s_x \times t(P_2, v). \qquad (7.19)$$

Значення s_x і Δ_x, знайдені при $n_j = 1$, є характеристиками відтворюваності (збіжності) аналітичної методики, якщо x — концентрація, а y — функція x.

Зазвичай результати статистичної обробки за методом найменших квадратів зводять у Табл. 7.2.

Примітка 1. Якщо метою експериментальної роботи було визначення констант b і a, стовпчики 11, 12 і 13 Табл. 7.2 не заповнюються.

Примітка 2. Якщо $y = b \lg x + a$, обчислення, описані в розділі 7, виконують із використанням рівнянь (1.8), (1.9), (1.29–1.32).

Примітка 3. Порівняння дисперсій s_0^2, одержаних за різних умов для двох лінійних залежностей, може бути проведене, як зазначено в розділі 3.

8. ПРИКЛАДИ

8.1. ОБЧИСЛЕННЯ СЕРЕДНЬОГО ЗНАЧЕННЯ ТА ДИСПЕРСІЇ

При визначенні вмісту стрептоциду в лініменті стрептоциду були одержані такі дані (Табл. 8.1).

$n = 5$; $v = n - 1 = 5 - 1 = 4$

$$\overline{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} = \frac{9.52 + 9.55 + 9.83 + 10.12 + 10.33}{5} = 9.87,$$

Таблиця 7.2

Результати статистичної обробки експериментальних даних, одержаних при вивченні лінійної залежності вигляду $y = bx + a$

v	$\overline{x}$	$\overline{y}$	b	a	$t(P_2, v)$ при $P_2 = 95\ \%$	Δ_b	Δ_a	s_0^2	R_c	s_x при $n_j = 1$ $y_j = \overline{y}$	Δ_x	$\frac{\Delta_x \times 100}{\overline{x}}$
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13

Таблиця 8.1

i	1	2	3	4	5
x_i, %	9.52	9.55	9.83	10.12	10.33

$d_i = |x_i - \overline{x}| = |x_i - 9.87|$ тобто $d_1 = |9.52 - 9.87| = 0.35$ тощо.

$$s^2 = \frac{\sum_{i=1}^{n} d_i}{\nu} = \frac{\sum_{i=1}^{n} x_i^2 - n \times \overline{x}^2}{\nu} =$$

$$= \frac{(9.52^2 + 9.55^2 + 9.83^2 + 10.12^2 + 10.33^2) - 5 \times 9.87^2}{4} =$$

$$= 0.1252,$$

$$s = \sqrt{s^2} = \sqrt{0.1252} = 0.3538,$$

$$s_r = \frac{s}{\overline{x}} = \frac{0.3538}{9.87} = 0.03585,$$

$$RSD = s_r \times 100 = 3.59\ \%,$$

$$s_{\overline{x}} = \frac{s}{\sqrt{n}} = \frac{0.3538}{\sqrt{5}} = 0.1582,$$

$$s_{\overline{x},\,r} = \frac{s_{\overline{x}}}{\overline{x}} = \frac{0.1582}{9.87} = 0.01603,$$

$$RSD_{\overline{x}} = s_{\overline{x},\,r} \times 100 = 1.60\ \%.$$

8.2. ПЕРЕВІРКА ОДНОРІДНОСТІ ВИБІРКИ МАЛОГО ОБСЯГУ

При проведенні дев'яти ($n = 9$) визначень вмісту загального азоту у плазмі крові щурів були одержані такі дані (у порядку зростання) (Табл. 8.2).

За рівняннями (1.10) і (1.11а) обчислюємо:

$$R = |x_1 - x_{n-1}| = |0.62 - 0.98| = 0.36,$$

$$Q_1 = \frac{|x_1 - x_2|}{R} = \frac{|0.62 - 0.81|}{0.36} = 0.53,$$

За Табл. 10.1 Додатка обчислюємо:

$$Q(95\ \%;\ 9) = 0.46 < Q_1 = 0.53$$

$$Q(99\ \%;\ 9) = 0.55 > Q_1 = 0.53$$

Отже, гіпотеза про те, що значення $x_1 = 0.62$ має бути виключене з розглядуваної сукупності результатів вимірів як обтяжене грубою похибкою, може бути прийнята з довірчою ймовірністю 95 %, але має бути відкинута, якщо обране значення довірчої імовірності дорівнює 99 %.

8.3. ОБЧИСЛЕННЯ ДОВІРЧИХ ІНТЕРВАЛІВ І НЕВИЗНАЧЕНОСТЕЙ ВИМІРЮВАНЬ

У результаті визначення вмісту бензохінону в стандартному зразку хінгідрону були одержані такі дані ($n = 10$) (Табл. 8.3).

Обчислення за формулами (1.2, 1.4–1.7) дали такі результати:

$$\overline{x} = 49.96;\ \nu = 9;\ s^2 = 0.01366;\ s = 0.1169;$$
$$s_{\overline{x}} = 0.03696.$$

Довірчі інтервали результату окремого визначення і середнього результату при $P_2 = 95\ \%$ одержуємо відповідно до (1.22) і (1.25):

$$x_i \pm \Delta_x = x_i \pm t(P_2, \nu) \times s = x_i \pm t(95\ \%, 9) \times s =$$
$$x_i \pm 2.262\ \ 0.1169 = x_i \pm 0.26,$$

$$\overline{x} \pm \Delta_{\overline{x}} = \overline{x} \pm \frac{t(P_2, \nu) \times s}{\sqrt{n}} =$$

$$= 49.96 \pm \frac{2.262 \times 0.1169}{\sqrt{10}} = 49.96 \pm 0.08.$$

Тоді відносні невизначеності ε і $\overline{\varepsilon}$, відповідно до (1.28) і (1.28а), дорівнюють:

$$\varepsilon = \frac{\Delta_x}{\overline{x}} \times 100\ \% = \frac{0.26}{49.96} \times 100\ \% = 0.53\ \%,$$

$$\overline{\varepsilon} = \frac{\Delta_{\overline{x}}}{\overline{x}} \times 100\ \% = \frac{0.08}{49.96} \times 100\ \% = 0.17\ \%.$$

Таблиця 8.2

i	1	2	3	4	5	6	7	8	9
x_i, %	0.62	0.81	0.83	0.86	0.87	0.90	0.94	0.98	0.99

Таблиця 8.3

i	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
x_i, %	49.80	49.83	49.87	49.87	49.92	50.01	50.05	50.06	50.10	50.11

Позначаючи істинний вміст бензохінону в хінгідроні через μ, можна вважати, що з 95 % довірчою ймовірністю справедливі нерівності:

$$\mu - 0.26 \le x_i \le \mu + 0.26,$$

$$x_i - 0.26 \le \mu \le x_i + 0.26 \text{ (при будь-якому } i),$$

$$\mu - 0.08 \le \overline{x} \le \mu + 0.08,$$

$$\overline{x} - 0.08 \le \mu \le \overline{x} + 0.08 \text{ (при } n = 10).$$

8.4. ПЕРЕВІРКА ГІПОТЕЗИ РІВНОСТІ ДИСПЕРСІЙ

8.4.1. Об'єднання результатів вибірок, різних за обсягом

У процесі проведення внутрішньолабораторних досліджень невизначеності методики титрування субстанції кислоти ацетилсаліцилової чотирма (тобто $g = 4$, $\nu_\chi = 3$) різними аналітиками одержані середні значення $\overline{x}_k$ і відносні стандартні відхилення (RSD_k%) для зазначеного числа випробувань (n_k), які представлені в Табл. 8.4.

Чи можна вважати дані RSD_k вибірками з однієї генеральної сукупності та які об'єднане $\overline{x}$ і RSD_p?

Спочатку перевіряють гіпотезу рівності дисперсій, тобто що всі RSD_k є вибірками з однієї генеральної сукупності.

Величину ν_p обчислюють за формулою (1.15):

$$\nu_p = \sum_{k=1}^{g} \nu_k = 4 + 6 + 8 + 7 = 25.$$

RSD_p^2 обчислюють за формулою (1.14b):

$$RSD_p^2 = \frac{\sum_{k=1}^{g} \nu_k \times RSD_k^2}{\nu_p} =$$

$$= \frac{4 \times 0.3^2 + 6 \times 0.8^2 + 8 \times 0.7^2 + 7 \times 0.9^2}{25} = 0.552.$$

χ^2 обчислюють за формулою (1.17):

$$\chi^2 = 2.303 \times \left(\nu_p \times \lg RSD_p^2 - \sum_{k=1}^{g} \nu_k \times \lg RSD_k^2 \right) =$$

$$= 2.303 \times \left(\begin{array}{c} 25 \times \lg 0.552 - (4 \times \lg 0.09 + \\ + 6 \times \lg 0.64 + 8 \times \lg 0.49 + 7 \times \lg 0.81) \end{array} \right) =$$

$$= 4.62.$$

Табличне значення (за Табл. 10.3) $\chi^2(P_1 = 95\,\%, \nu_\chi = 3) = 7.815 > 4.62$.

Отже, значення χ^2 менше критичного, тому можна прийняти гіпотезу про рівність дисперсій.

Значення χ^2 менше критичного, і тому немає необхідності в розрахунку коригувального фактора C і величини χ^{*2}. Для ілюстрації ці величини обчислюють за формулою (1.18):

$$C = \frac{[(1/4) + (1/6) + (1/8) + (1/7)] - (1/25)}{3 \times (4-1)} + 1 = 1.072,$$

$$\chi^{*2} = \chi^2 / C = 4.62 / 1.072 = 4.31.$$

Як видно, значення χ^{*2} менше критичного значення (7.815), що підтверджує гіпотезу про рівність дисперсій.

Обчислюють об'єднане RSD_p:

$$RSD_p = \sqrt{RSD_p^2} = \sqrt{0.552} = 0.74\,\%.$$

Об'єднане середнє $\overline{x}$ за всіма чотирма вибірками обчислюють за формулою (1.16):

$$\overline{x} = \frac{99.9 \times 5 + 99.4 \times 7 + 99.2 \times 9 + 99.3 \times 8}{5 + 7 + 9 + 8} = 99.4\,\%.$$

Таким чином, за даними внутрішньолабораторних випробувань, відносне стандартне відхилення титрування субстанції кислоти ацетилсаліцилової дорівнює 0.74 %, а її вміст — 99.4 %.

8.4.2. Об'єднання результатів вибірок, однакових за обсягом

При аналізі методом ВЕРХ п'яти різних серій (тобто $g = 5$) лікарського засобу одержані такі значення відносних стандартних відхилень (RSD_i%) площ піків при 3-разовому (тобто $n = 3$) хроматографуванні розчинів кожної серії:

1.08 %; 0.60 %; 0.43 %, 1.59 % і 0.71 %.

Чи можна об'єднувати дані вибірки (результати аналізу п'яти серій) і яке об'єднане відносне стандартне відхилення?

Таблиця 8.4

вибірка	$\overline{x}_k$	RSD_k %	n_k	ν_k	ν_p	RSD_p^2	RSD_p %	χ^2	C	χ^{*2}	Табличне $\chi^2(P_1 = 95\,\%, \nu_\chi = 3)$
1	99.9	0.3	5	4	25	0.552	0.74	4.62	1.072	4.31	7.815
2	99.4	0.8	7	6							
3	99.2	0.7	9	8							
4	99.3	0.9	8	7							

Оскільки в нашому випадку число ступенів свободи для всіх п'яти вибірок (серій) однакове і дорівнює $v_k = n - 1 = 3 - 1 = 2$, для перевірки гіпотези рівності дисперсій застосовують критерій Кокрена (див. розділ 1.3.3 і Табл. 10.4). При $s_{max} = 1.59$ %, $v_k = 2$, $g = 5$, співвідношення (1.19) дає:

$$G = \frac{s^2_{\max}}{\sum_{k=1}^{g} s_k^2} = \frac{1.59^2}{1.08^2 + 0.60^2 + 0.43^2 + 1.59^2 + 0.71^2} =$$

$$= 0.533 < 0.684 = G(P = 95\,\%; 2; 5)$$

Як видно, розраховане значення G менше табличного на 95 % рівні значущості. Отже, дані вибірки можна об'єднати.

Об'єднане число ступенів свободи обчислюють за формулою (1.15):

$$v_p = \sum_{k=1}^{g} v_k = 5 \times 2 = 10.$$

Об'єднане відносне стандартне відхилення (RSD_p) обчислюють за формулою (1.14b):

$$RSD_p^2 = \frac{\sum_{k=1}^{g} \nu_k \times RSD_k^2}{\nu_p} = \frac{2 \times (1.08^2 + 0.60^2 + 0.43^2 + 1.59^2 + 0.71^2)}{10} = 0.9510.$$

Звідси $RSD_p = \sqrt{0.9510} = 0.98$.

8.5. ПОРІВНЯННЯ ДВОХ МЕТОДИК АНАЛІЗУ ЗА ПРЕЦИЗІЙНІСТЮ І ПРАВИЛЬНІСТЮ РЕЗУЛЬТАТІВ. СТАТИСТИЧНА І ПРАКТИЧНА ЗНАЧУЩІСТЬ СИСТЕМАТИЧНОЇ ПОХИБКИ

8.5.1. Збіжність та наявність статистично значущої систематичной похибки

Нехай для двох вибірок аналітичних даних (1 і 2), що характеризують, наприклад, різні методики аналізу лікарського засобу з допусками 90–110% від номінального вмісту, одержані метрологічні характеристики, наведені в стовпчиках 1–10 Табл. 8.5.

Для заповнення стовпчика 10 обчислюють значення t_1 і t_2:

$$t_1 = \frac{|\mu - \bar{x}_1| \times \sqrt{m_1}}{s_1} = \frac{|100 - 100.74| \times \sqrt{11+1}}{1.20} = 2.14,$$

$$t_2 = \frac{|\mu - \bar{x}_2| \times \sqrt{m_2}}{s_2} = \frac{|100 - 99.65| \times \sqrt{12+1}}{0.33} = 3.82.$$

Оскільки $t_1 = 2.14 < t_1(95\,\%, 11) = 2.20$, гіпотеза $|\mu_1 - \bar{x}_1| \neq 0$ може бути відкинута, що дозволяє вважати результати вибірки 1 вільними від систематичної похибки.

Навпаки, оскільки $t_2 = 3.82 >> t_2(95\,\%, 12) = 2.18$, гіпотезу $|\mu_2 - \bar{x}_2| \neq 0$ визнають статистично вірогідною, що свідчить про наявність систематичної похибки в результатах вибірки 2. У стовпчик 13 вносять:

$$\delta_2 = \frac{|\mu_1 - \bar{x}_2|}{\mu_1} \times 100\,\% = \frac{|100 - 99.65|}{100} \times 100\,\% = 0.35\,\%.$$

Заповнюють стовпчики 11 і 12:

$$(99\,\%; 11; 12) = 4.22,$$

$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2} = \frac{1.20^2}{0.33^2} = 13.22,$$

$$F = 13.22 >> F(99\,\%; 11; 12) = 4.22.$$

Таблиця 8.5

Вибірка	μ	v	$\bar{x}$, %	S	P_2,%	**t(P_2, v) (табл.)**	Δx	ε	$t_{обч}$	**$F(P_1, v_1, v_2)$ (табл.) P = 99 %**	$F_{обч}$	δ %
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1	100	11	100.74	1.20	95	2.20	2.64	2.62	2.14	4.22	13.22	-
2	100	12	99.65	0.33	95	2.18	0.72	0.72	3.82	-	-	0.35

Отже, при $P_1 = 99\ \%$ гіпотезу про розходження дисперсій s_1^2 і s_2^2 слід визнати статистично вірогідною.

Висновки щодо збіжності і наявності статистично значущої систематичної похибки:

а) результати, одержані з використанням першої методики, є правильними, тобто вони не обтяжені систематичною похибкою;

б) результати, одержані з використанням другої методики, обтяжені систематичною похибкою;

в) за прецизійністю друга методика значно краща за першу.

8.5.2. Наявність практично значущої систематичної похибки

Згідно з рекомендаціями Табл. 5 загальної статті *5.3.N.2 «Валідація аналітичних методик і випробувань»*, при кількісному визначенні готових лікарських засобів з допусками 90–110 % від номінального вмісту систематична похибка є практично незначущою, якщо вона не перевищує 1.02 %. У випадку другої методики, згідно з Табл. 8.5, ми маємо:

$$\delta_2 = 0.35 < 1.02\ \%.$$

Отже, друга методика обтяжена систематичною похибкою, яка є статистично значущою, але є практично незначущою для контролю якості лікарського засобу з допусками вмісту 90–100 % від номінального значення.

Даний приклад добре ілюструє недостатність тільки статистичної оцінки значущості систематичної похибки для оцінки придатності аналітичної методики для контролю якості. Перша методика має вдвічі більшу систематичну похибку ($\delta_1 = 0.74\ \%$), ніж друга методика ($\delta_2 = 0.35\ \%$), але за рахунок значно гіршої прецизійності ($s_1 = 1.20\ \%$), ніж у першої методики ($s_2 = 0.33\ \%$), систематична похибка в першій методиці маскується і є статично незначущою. У другій методиці, за рахунок високої прецизійності, систематична похибка є статистично значущою, хоча вона майже вдвічі менша, ніж в першій методиці. Застосування практичної значущості систематичної похибки дозволяє вирішити цю проблему.

Висновок:

Для контрою якості лікарського засобу з допусками вмісту 90–110 % від номінального значення, друга методика значно краще підходить для вирішення поставленої аналітичної задачі, ніж перша.

8.6. ПОРІВНЯННЯ СЕРЕДНІХ РЕЗУЛЬТАТІВ ДВОХ ВИБІРОК

8.6.1. Використання дисперсій

При визначенні вмісту основної речовини у двох зразках препарату, виготовлених за різною технологією, одержані метрологічні характеристики середніх результатів, які наведені в Табл. 8.6. Слід вирішити, чи є перший зразок за даним показником кращим порівнюючи з другим зразком.

Оскільки

$$F = \frac{s_2^2}{s_1^2} = \frac{0.31}{0.25} = 1.24 < F(95\ \%, 5, 7) = 3.97,$$

згідно з нерівністю (3.3) статистично вірогідне розходження величин s_1^2 і s_2^2 відсутнє.

Отже, гіпотеза $\overline{x}_1 = \overline{x}_2$ (5.1) перевіряється за допомогою рівнянь (1.14), (1.15), (5.2) та (5.3).

$$s_p^2 = \frac{\sum_{k=1}^{g}\left[(n_k - 1)\times s_k^2\right]}{\sum_{k=1}^{g}(n_k - 1)} = \frac{v_1 \times s_1^2 + v_2 \times s_2^2}{v_1 + v_2} =$$

$$= \frac{7 \times 0.25 + 5 \times 0.31}{7 + 5} = 0.275,$$

$$s_p = \sqrt{s_p^2} = \sqrt{0.275} = 0.524$$

$$s_d^2 = \frac{s_p^2 \times (n_1 + n_2)}{n_1 \times n_2} = \frac{0.275 \times (8 + 6)}{8 \times 6} = 0.0802,$$

$$s_d = \sqrt{s_d^2} = \sqrt{0.0802} = 0.283,$$

$$v = n_1 + n_2 - 2 = 8 + 6 - 2 = 12,$$

$$t = \frac{|\overline{x}_1 - \overline{x}_2|}{s_d} = \frac{|99.10 - 98.33|}{0.283} = 2.72,$$

$$t = 2.72 > t(95\ \%;\ 12) = 2.18,$$

$$t = 2.72 < t(99\ \%;\ 12) = 3.08.$$

Отже, із довірчою ймовірністю $P_2 = 95\ \%$ гіпотеза $\overline{x}_1 \neq \overline{x}_2$ може бути прийнята (тобто перший зразок краще другого за вмістом основної речовини). Однак з довірчою ймовірністю $P_2 = 99\ \%$ прийняти цю гіпотезу не можна через недостатність інформації.

Таблиця 8.6

Зразок	n	v	$\bar{x}$, (%)	s	$s_{\bar{x}}$	P_2, (%)	$t(P_2, v)$	Δx	$\Delta\bar{x}$	$\bar{\varepsilon}$, (%)
0	1	2	3	5	6	7	8	9	10	11
1	8	7	99.10	0.50	0.18	95	2.36	1.18	0.42	0.42
2	6	5	98.33	0.56	0.23	95	2.57	1.44	0.59	0.60

Якщо гіпотеза $\bar{x}_1 \neq \bar{x}_2$ прийнята, визначають довірчий інтервал різниці генеральних середніх $\hat{x}_1 - \hat{x}_2$ (рівняння (5.10)):

$$|\bar{x}_1 - \bar{x}_2| - t(P_2, v) \times s_P \leq |\hat{x}_1 - \hat{x}_2| \leq |\bar{x}_1 - \bar{x}_2| + t(P_2, v) \times s_P$$

$$(P_2 = 95\ \%;\ \nu = 12),$$

$$|99.10 - 98.33| - 2.18 \times 0.283 \leq |\hat{x}_1 - \hat{x}_2| \leq |99.10 - 98.33| + 2.18 \times 0.283$$

$$0.15 \leq |\hat{x}_1 - \hat{x}_2| \leq 1.39.$$

8.6.2. Використання максимально допустимої невизначеності

При проведенні кількісного визначення таблеток парацетамолу 0.2 г методом абсорбційної спектрофотометрії за валідованою фармакопейною методикою в різних лабораторіях були отримані такі результати: 98.2 і 96.1 % від номінального вмісту. Різниця між результатами становить $|x_2 - x_1| = |96.1 - 98.2| = 2.1$ %.

Відповідно до специфікації, допуски вмісту парацетамолу становлять ± 5.0 % від номінального вмісту. Чи можна вважати різницю 2.1 % між результатами різних лабораторій статистично значущою з погляду валідованої методики?

Відповідно до загальної статті *2.2.N.2 «Валідація аналітичних методик і випробувань»*, максимально допустима невизначеність методики кількісного визначення готового лікарського засобу з допусками вмісту ± 5.0 % становить $max\Delta_{As} = 0.32 \times 5.0 = 1.6$ %. Співвідношення (5.13) тоді буде мати вигляд $|x_2 - x_1| \leq \sqrt{2} \times 1.6 = 2.3$ %, що перевищує фактичну різницю (2.1 %). Отже, різницю між результатами двох різних лабораторій не можна вважати статистично значущою.

8.7. ЗАБЕЗПЕЧЕННЯ ЯКОСТІ РЕЗУЛЬТАТІВ

8.7.1. Кваліфікація градуйованої піпетки місткістю 5 мл

Кваліфікацію піпетки проводили для об'ємів 1, 2, 3, 4 і 5 мл, які охоплюють весь її діапазон і найчастіше використовуються на практиці.

Кваліфікація проводилася за такою схемою. Піпетку заповнювали водою до відповідного об'єму і виливали в зважену конічну колбу, яку потім знову зважували. За різницею встановлювали масу води, яку перераховували на фактичну місткість піпетки. Операцію повторювали ще 4 рази. Для кожного об'єму розраховували стандартне відхилення. Усі п'ять отриманих стандартних відхилень об'єднували (s_p) за формулами (1.14–1.15). Об'єднане число ступенів свободи $v_p = 5 \times 4 = 20$. Метрологічна обробка результатів представлена в Табл. 8.7.

Вихідні дані для розрахунків

Температура води — 19.5 °С, відносна густина води при цьому становить 0.99833 г/мл.

Вимоги ISO для градуйованих піпеток класів A і AS об'ємом 5 мл: відхилення (ΔV) фактичного об'єму від номінального об'єму для кожної позначки не має перевищувати 0.030 мл, тобто $\Delta V \leq max\Delta_{ISO} = 0.030$ мл. Відповідно до співвідношення (6.2), отримаємо вимоги до невизначеності верифікації (Δ_{verif}):

$$\Delta_{verif} \leq \max \Delta_{verif} = 0.32 \times 0.030 = 0.0096 \text{ мл}.$$

Фактичне значення Δ_{verif} розраховували за рівнянням (6.3), де покладали: $n = 5$, $v_p = 20$, $t(95\ \%, 20) = 1.724$.

Як видно з Табл. 8.7, піпетка витримує вимоги ISO, тобто для кожного з перевірених об'ємів виконуються вимоги $\Delta V = < 0.030$ мл $= max\Delta_{ISO}$. При цьому забезпечується якість результату кваліфікації, оскільки $\Delta_{verif} = 0.0046$ мл $<$ 0.0096 мл $= \Delta_{verif}$.

8.8. ГАРАНТУЮЧІ ДОПУСКИ

Допуски вмісту діючої речовини в готовому лікарському засобі (ГЛЗ) знаходяться в межах (100 ± 5 %), тобто $100 - X_{Low} = 95$ %, $100 + X_{High} = 105.0$ % (див. рівняння (6.4)). Для отримання гарантуючих допусків вмісту діючої речовини можливе використання різних підходів.

8.8.1. Метрологічно атестована методика

У конкретній лабораторії підприємства проведена метрологічна атестація методики аналізу і знайдено генеральне відносне стандартне відхилення, яке дорівнює $RSD_{As} = 1.2$ %.

Згідно з рівняннями (6.7–6.8), для випробуваного зразка продукції середній результат аналізу у відсотках до номінального значення (X) при проведенні n паралельних визначень має знаходитися в гарантуючих межах:

$$100 - B_{Low} + \frac{U(P_1) \times RSD_{As}}{\sqrt{n}} \le X \le$$
$$\le 100 + B_{High} - \frac{U(P_1) \times RSD_{As}}{\sqrt{n}}.$$

Для забезпечення якості ГЛЗ з надійністю $P_1 = 99$ % результати аналізу при випуску продукції для $n = 3$ мають знаходитися в межах:

$$95.0 + \frac{2.33 \times 1.20}{\sqrt{3}} \le X \le 105.0 - \frac{2.33 \times 1.20}{\sqrt{3}};$$

$$96.61\ \% \le X \le 103.39\ \%.$$

Для надійності $P_1 = 95$ % гарантуючі допуски відповідно будуть:

$$95.0 + \frac{1.65 \times 1.20}{\sqrt{3}} \le X \le 105.0 - \frac{1.65 \times 1.20}{\sqrt{3}},$$

$$96.14\ \% \le X \le 103.86\ \%.$$

Відзначимо, що ці результати є дійсними тільки для даної лабораторії.

8.8.2. Валідована методика

Цей підхід спирається на загальну статтю *5.3.N.2 «Валідація аналитичних методик і випробувань»*.

Повна невизначеність методики аналізу при симетричних допусках $(100 \pm B)\ \% = 95.0–105.0\ \%$ не має перевищувати в нашому випадку величини:

$$\Delta_{As} \le 0.32 \times B = \max \Delta_{As} = 0.32 \times 5.0 = 1.6\ \%.$$

Для надійності $P_1 = 95$ % гарантуючі допуски будуть:

Таблиця 8.7

Результати проведення кваліфікації піпеток з однією позначкою об'ємом 5 мл

Об'єм, мл	**Маса, г**	**Фактичний об'єм, V, мл**	**Середнє, $\overline{V}$, мл**	**Стандартне відхилення, S_{verif}, мл**	**$\lvert\Delta V\rvert$ мл $\le$ 0.030**
1.0.	0.99290	0.99456			
	0.99312	0.99478			
	0.99294	0.99460			
	0.99890	1.00057			
	0.99125	0.99291	0.99548	0.0029	0.0045
2.0	2.00222	2.00557			
	1.99155	1.99488			
	2.00241	2.00576			
	1.99360	1.99693			
	1.98778	1.99111	1.99885	0.0066	0.0011
3.0	2.98079	2.98578			
	2.98677	2.99177			
	2.99007	2.99507			
	2.97754	2.98252			
	2.98138	2.98637	2.98830	0.0050	0.0117
4.0	3.99944	4.00613			
	3.99981	4.00650			
	3.98321	3.98987			
	3.98135	3.98801			
	3.98943	3.99610	3.99732	0.0087	0.0027
5.0	5.00429	5.01266			
	4.99993	5.00829			
	4.99555	5.00391			
	4.99393	5.00228			
	4.99238	5.00073	5.00558	0.0049	0.0056
Об'єднане стандартне відхилення, s_p =				0.0060	
$\Delta_{verif} = 1.724 \times 0.00595/\sqrt{5} =$				**0.0046** $\le$ 0.0096	

$$95.0 + 1.6 \le X \le 105.0 - 1.6,$$

$$96.6\ \% \le X \le 103.4\ \%.$$

Відзначимо, що ці гарантуючі допуски є коректними тільки для однорідних ГЛЗ (розчинів, ін'єкцій тощо).

8.8.3. Урахування факторів неоднорідності для дозованих одиниць

При проведенні валідації технології виробництва таблеток отримані такі значення: генеральне середнє вмісту $X_0 = 99.0\ \%$, генеральне відносне стандартне відхилення неоднорідності вмісту таблеток $RSD_{unif} = 4.0\ \%$. Відповідно до (6.13), довірчий інтервал фактора неоднорідності дорівнює $\Delta_{\text{unif}} = 0.37 \times 4.0 = 1.5\ \%$.

Оскільки допуски вмісту за специфікацією є 95.0–105.0 %, то $max\Delta_{As} = 1.6\ \%$ (див. вище).

Беручи це до уваги, згідно зі співвідношенням (6.14), для надійності $P_1 = 95\ \%$ гарантуючі допуски будуть:

$$99.0 - 1.5 - 1.6 \le X \le 99.0 + 1.5 + 1.6,$$

$$95.9\ \% \le X \le 102.1\ \%.$$

Критичним є гарантуючий допуск 95.9 %, бо він близький до нижнього допуску специфікації 95.0 %.

8.8.4. Граничні допуски вмісту за специфікацією для дозованих одиниць

Зазвичай кількісне визначення дозованих одиниць (зокрема, таблеток) проводиться з порошку 20 одиниць, тобто $n = 20$. Для дозованих готових лікарських засобів найбільш жорсткі вимоги для невизначеності методики аналізу дорівнюють $max\Delta_{As} = 1.6\ \%$ (див. *5.3.N.2 «Валідація аналітичних методик і випробувань» (Таблиця 3)*).

Згідно з вимогами статті *2.9.40 «Одноріднісь дозованих одиниць»*, максимальне допустиме значення відносного довірчого інтервалу неоднорідності вмісту діючої речовини в окремих дозованих одиницях ($max\Delta_{unif}$) дорівнює $L1 = 15\ \%$.

Тоді зі співвідношення (6.15) отримаємо найбільш жорсткі гарантуючі допуски вмісту діючої речовини за специфікацією для дозованих готових лікарських засобів:

$$100 - \frac{15}{\sqrt{20}} - 1.6 \le X \le 100 + \frac{15}{\sqrt{20}} + 1.6,$$

$$95.0\ \% \le X \le 105.0\ \%.$$

Як видно, найбільш жорсткі гарантуючі допуски співпадають з допусками специфікації 95.0–105.0 %. Отже з урахуванням факторів неоднорідності допуски кількісного вмісту 95.0–105.0 % для дозованих одиниць можна вважати граничними.

Крім того, цей приклад показує, що у випадку допусків специфікації 95.0–105.0 % для отримання гарантуючих допусків необхідно мати технологію з довірчим інтервалом неоднорідності вмісту діючої речовини вдвічі меншим, ніж $L1 = 15\ \%$.

8.9. ОЦІНКА РЕЗУЛЬТАТІВ ТЕСТУВАННЯ

8.9.1. Внутрішньолабораторне тестування персоналу за результатами верифікації градуйованої піпетки місткістю 5 мл

Проведення внутрішньолабораторного тестування персоналу доцільно поєднати з верифікацією піпеток. При цьому виконання вимог (6.2) до довірчого інтервалу верифікації є підтвердженням відповідності учасника тестування вимогам атестації.

Зокрема, у випадку верифікації градуйованої піпетки місткістю 5 мл (див. розділ 8.7.1) було отримано:

$$\Delta_{verif} = 0.0046 < max\ \Delta_{verif} = 0.0096.$$

Як видно, виконуються вимоги співвідношення (6.2). Отже, учасник внутрішньолабораторного тестування відповідає вимогам атестації.

8.9.2. Зовнішнє тестування: визначення домішки В лінкоміцину в тестовому зразку лінкоміцину методом ВЕРХ

Згідно з вимогами специфікації на субстанцію лінкоміцину гідрохлориду, вміст домішки В не має перевищувати 5.0 %. Визначення проводиться методом ВЕРХ в межах тестів «Випробування на чистоту».

Дане випробування в специфікації є граничним. Крім того, визначення домішки В може проводитися як кількісне, наприклад, при дослідженнях стабільності. Тому організатори провели зовнішнє тестування на двох рівнях: як граничне і як кількісне випробування.

Згідно з рекомендаціями Таблиці 3 загальної статті *5.3.N.2 «Валідація аналітичних методик і випробувань»*, невизначеність аналітичної методики не має перевищувати:

для граничного випробування — 16 % від допуску, тобто:

$$max\Delta_{Imp}\,(limit) = 16 \times 5.0/100 = 0.80\ \%\ \text{абс},$$

для кількісного випробування – 5%, тобто:

$$max\Delta_{Imp}\,(assay) = 5.0 \times 5.0/100 = 0.25\ \%\ \text{абс}.$$

Для проведення зовнішнього тестування лабораторій був атестований тестовий зразок лінкоміцину на вміст домішки В. Атестоване значення її вмісту дорівнює:

$$X_{Assign} = X_{Attest} = 3.17\ \%.$$

Оскільки тестування проводилося на двох рівнях вимог до невизначеності методики аналізу (0.80 % і 0.25 %), то невизначеність атестованого значення була незначущою порівнюючи з найбільш жорсткими вимогами до методики аналізу, тобто відповідно до (6.23):

$$\Delta_{Attest} \le \max\Delta_{Attest} = 0.32 \times max\Delta_{Imp}\,(assay) = 0.32 \times 0.25 = 0.080\ \%.$$

Оцінка результатів учасників

Фактичні значення вмісту домішки В учасників оцінювалися на двох рівнях.

1) Здатність до граничного контролю домішки В методом ВЕРХ. У цьому випадку результати учасників (X_i) не мають відрізнятися ($bias_i$) від атестованого вмісту (X_{Attest}) більше ніж на $max\Delta_{Imp}\,(limit) = 0.80\ \%$, тобто відповідно до (6.16–6.17) маємо:

$$bias_i = |X_i - X_{Attest}| \le 0.80\ \%.$$

Учасники, результати яких задовольняють ці вимоги, вважалися такими, що можуть коректно проводити граничне визначення домішки В методом ВЕРХ. Усі інші результати вважалися некоректними.

2) Здатність до кількісного визначення домішки В методом ВЕРХ. У цьому випадку результати учасників (X_i) не мають відрізнятися ($bias_i$) від атестованого вмісту (X_{Attest}) більше ніж на $max\Delta_{Imp}\,(assay) = 0.25\ \%$, тобто відповідно до (6.16–6.17), маємо

$$bias_i = |X_i - X_{Attest}| \le 0.25\ \%.$$

Учасники, результати яких задовольняють цим вимоги, вважалися такими, що можуть коректно проводити граничне визначення домішки В методом ВЕРХ. Усі інші результати вважалися некоректними.

Таблиця 8.8

Результати визначення домішки В лінкоміцину в тестовому зразку

№ п/п	Вміст домішки, %	± *bias* 1) ≤ 0.80 % 2) ≤ *0.25* %	№ п/п	Вміст домішки, %	± *bias* 1) ≤ 0.80 % 2) ≤ *0.25* %
1	3.17	0.00	19	3.08	-0.09
2	3.16	-0.01	20	3.26	0.09
3	3.16	-0.01	21	3.27	0.10
4	3.16	-0.01	22	3.05	-0.12
5	3.16	-0.01	23	3.04	-0.13
6	3.18	0.01	24	3.03	-0.14
7	3.18	0.01	25	3.31	0.14
8	3.19	0.02	26	3.01	-0.16
9	3.19	0.02	27	3.36	0.19
10	3.14	-0.03	28	3.36	0.19
11	3.20	0.03	29	3.37	0.20
12	3.13	-0.04	30	3.38	0.21
13	3.12	-0.05	31	3.38	0.21
14	3.22	0.05	32	2.91	-0.26
15	3.11	-0.06	33	2.85	-0.32
16	3.10	-0.07	34	2.80	-0.37
17	3.10	-0.07	35	0.19	-2.98
18	3.10	-0.07			
Середнє $\overline{X}$				3.07	
Стандартне відхилення s				0.52	
Критерій $3 \times s$				1.56	
Кориговане середнє $\overline{X}(cor)$ (без № 35)				3.15	
Атестоване значення X_{Attest}				3.17	
$\lvert\overline{X}(cor) - X_{Attest}\rvert$				0.02	$< max\Delta_{Imp} = 0.08$

Оцінка результатів учасників зовнішнього тестування представлена в Табл. 8.8.

Як видно, результати учасника № 35 не відповідають вимогам як до граничного (≤ 0.80 %), так і кількісного (≤ 0.25 %) випробувань. Усі інші учасники відповідають вимогам до проведення граничного випробування.

Учасники № 32, 33, 34 і 35 (шрифт — італік і підкреслення) не відповідають вимогам до кількісного випробування (≤ 0.25 %). Усі інші учасники відповідають вимогам до кількісного визначення домішки В методом ВЕРХ.

Виключення результатів, що випадають, і розрахунок метрологічних характеристик вибірки учасників

Як видно з Табл. 8.8, вимогам 3*s*-критерію (1.13) не відповідає тільки результат № 35 (*bias* = 2.98 > 1.56 %), який був виключений з подальших розрахунків коригованого середнього $\overline{X(cor)}$.

Перевірка наявності систематичної похибки результатів учасників.

Згідно з вимогами (6.13), має виконуватися співвідношення

$$|\overline{X(cor)} - X_{Attest}| \le \max \Delta_{Attest} = 0.08\ \%.$$

Як видно з Табл. 8.8, цей критерій витримується. Отже, результати учасників не обтяжені систематичною похибкою (зсувом результатів щодо атестованого значення), а саме атестоване значення є коректним.

Загальна характеристика якості результатів учасників

Згідно з Табл. 6.2, критична кількість некоректних результатів для кількості учасників $n = 35$ дорівнює $\mu = 5.6$. У нашому випадку кількість некоректних результатів для граничного випробування дорівнює $\mu = 1$, а для кількісного випробування $\mu = 4$. Отже, для обох випадків кількість некоректних результатів не є критичною.

9. РОЗРАХУНОК НЕВИЗНАЧЕНОСТІ ФУНКЦІЇ ДЕКІЛЬКОХ ВИПАДКОВИХ ЗМІННИХ

Наведені в попередніх розділах розрахунки довірчих інтервалів невизначеності методик аналізу застосовні лише в тому разі, якщо вимірювана величина (концентрація, вміст тощо.) є функцією тільки однієї випадкової змінної. Така ситуація зазвичай виникає при використанні прямих методів аналізу (титрування, визначення сульфатної золи, важких металів тощо). Однак більшість методик кількісного визначення у фармакопейному аналізі є непрямими, тобто використовують стандартні зразки. Отже, вимірювана величина є функцією як мінімум двох випадкових змінних — аналітичних сигналів (оптична густина, висота або площа піка тощо.) випробовуваного і стандартного зразків. Крім того, нерідко виникає проблема прогнозування невизначеності аналітичної методики, що складається з декількох стадій (зважування, розведення, кінцева аналітична операція), кожна з яких є проти іншої випадковою величиною.

Отже, виникає загальна проблема оцінки невизначеності непрямо вимірюваної величини, яка залежить від декількох вимірюваних величин, зокрема, як розраховувати невизначеність усієї аналітичної методики, якщо відомі невизначеності окремих її складових (стадій)?

Якщо вимірювана у випробуванні величина y є функцією n незалежних випадкових величин x_i, тобто

$$y = f(x_1, x_2, \ldots x_n), \qquad (9.1)$$

і число ступенів свободи величин x_i однакові або досить великі (> 30, щоб можна було застосовувати статистику Гауса, а не Стьюдента), дисперсія величини y пов'язана з дисперсіями величин x_i співвідношенням (правило поширення невизначеностей):

$$s_y^2 = \sum_{i=1}^{n} \left(\frac{\partial f}{\partial x_i} \right)^2 \times s_{xi}^2. \qquad (9.2)$$

Однак на практиці ступені свободи величин x_i зазвичай невеликі та нерівні один одному. Крім того, зазвичай інтерес становлять не самі дисперсії (стандартні відхилення), а довірчі інтервали, обчислити які, використовуючи рівняння (9.2) при невеликих і неоднакових ступенях свободи, неможливо. Тому для розрахунку невизначеності величини y (Δ_y) запропоновані різні підходи, серед яких можна виділити два основних: лінійна модель і підхід Уелча-Сатертуейта.

9.1. ЛІНІЙНА МОДЕЛЬ

Якщо випадкові змінні x_i статистично незалежні, довірчий інтервал невизначеності функції Δ_y зв'язаний із довірчими інтервалами змінних Δ_{xi} співвідношенням (довірчі інтервали беруть для тієї самої імовірності):

$$\Delta_y^2 = \sum_{i=1}^{n} \left(\frac{\partial f}{\partial x_i} \right)^2 \times \Delta_{xi}^2, \qquad (9.3)$$

Дане співвідношення є узагальненням співвідношення (9.2).

У фармакопейному аналізі вимірювана величина *y* являє собою зазвичай добуток чи частку випадкових і постійних величин (мас наважок, розведень, оптичних густин або площ піків тощо.), тобто (*K* — певна константа):

$$y = \frac{K \times x_1 \times x_2 \times ... x_m}{x_{m+1} \times x_{m+2} \times ... x_n}. \qquad (9.4)$$

У цьому випадку співвідношення (9.3) набуває вигляду:

$$\Delta^2_{y,r} = \sum_{i=1}^{n} \Delta^2_{xi,r}, \qquad (9.5)$$

де використані відносні довірчі інтервали.

У деяких випадках вимірювана величина *y* являє собою суму або різницю випадкових і постійних величин, тобто (K_i — певні константи):

$$y = \sum_{i=1}^{n} K_i \times x_i. \qquad (9.6)$$

У цьому випадку співвідношення (9.3) набуває вигляду:

$$\Delta^2_y = \sum_{i=1}^{n} K_i^2 \times \Delta^2_{x,i}, \qquad (9.7)$$

де використані абсолютні довірчі інтервали.

Співвідношення (9.5, 9.7) застосовні при будь-яких ступенях свободи (зокрема і нескінченних) для величин x_i. Їхньою перевагою є простота та наочність. Використання абсолютних довірчих інтервалів призводить до набагато більш громіздких виразів, тому рекомендується використовувати відносні величини.

При проведенні фармакопейного аналізу в сумарній невизначеності ($\Delta_{As,r}$) аналізу зазвичай завжди можна виділити такі типи невизначеностей: невизначеність пробопідготовки ($\Delta_{SP,r}$), невизначеність кінцевої аналітичної операції ($\Delta_{FAO,r}$) і невизначеність атестації стандартного зразка ($\Delta_{RS,r}$). Величина $\Delta_{RS,r}$ зазвичай настільки мала, що нею можна знехтувати. Із огляду на це, а також на те, що аналіз проводиться і для випробовуваного розчину (індекс «*smp*»), і для розчину порівняння (індекс «*st*»), вираз (9.5) можна навести у вигляді:

$$\Delta_{As,r} = \sqrt{\begin{matrix}[(\Delta^{smp}_{SP,r})^2 + (\Delta^{st}_{SP,r})^2] + \\ +[(\Delta^{smp}_{FAO,r})^2 + (\Delta^{st}_{FAO,r})^2]\end{matrix}}. \qquad (9.8)$$

При цьому кожний із доданків обчислюють із його складових компонентів за формулою (9.5).

Якщо число ступенів свободи величин x_i однакове або досить велике (> 30), вираз (9.5) дає

$$s^2_{y,r} = \sum_{i=1}^{n} s^2_{xi,r}. \qquad (9.9)$$

Це саме співвідношення за тих самих умов одержують із виразу (9.2).

9.1.1. Зважене середнє. Слід зазначити, що в межах лінійної моделі (9.3) можна одержати зважене середнє декількох нерівноточних вибірок різних генеральних сукупностей, використовуючи як ваги квадрати відповідних довірчих інтервалів. Якщо мають *g* вибіркових середніх $\overline{x}_k$ різних генеральних сукупностей, одержаних із невизначеностями $\Delta_{\overline{x},k}$, середнє цих вибірок $\overline{x}$ визначають із співвідношення:

$$\overline{x} = \frac{\sum_{k=1}^{g} (1 / \Delta^2_{\overline{x},k}) \times \overline{x}_k}{\sum_{k=1}^{g} (1 / \Delta^2_{\overline{x},k})}. \qquad (9.10)$$

Абсолютний довірчий інтервал $\Delta_{\overline{x}}$ цього зваженого середнього визначається із співвідношення:

$$\Delta^2_{\overline{x}} = \frac{1}{\sum_{k=1}^{g} (1 / \Delta^2_{\overline{x},k})}. \qquad (9.10a)$$

Якщо число ступенів свободи вибіркових середніх $\overline{x}_k$ однакове або досить велике (> 30), вираз (9.10) дає:

$$\overline{x} = \frac{\sum_{k=1}^{g} (1 / s^2_{x,k}) \times \overline{x}_k}{\sum_{k=1}^{g} (1 / s^2_{x,k})}, \qquad (9.11)$$

$$s^2_{\overline{x}} = \frac{1}{\sum_{k=1}^{g} (1 / s^2_{x,k})}, \qquad (9.11a)$$

де $s^2_{x,k}$ — дисперсія одиничного результату *k-тої* вибірки.

Відзначимо, що окремий випадок (9.11) набагато менш застосовний, ніж загальне співвідношення (9.10).

Вибіркові середні $\overline{x}_k$ зазвичай близькі між собою і до зваженого середнього $\overline{x}$, тому у співвідношеннях (9.10) і (9.10а) замість абсолютних довірчих інтервалів можуть бути використані відносні довірчі інтервали, а в співвідношеннях (9.11) і (9.11а) замість абсолютних дисперсій — відносні дисперсії.

Якщо вибірки являють собою, наприклад, результати аналізу тієї самої речовини в різ-

них лабораторіях, іноді виникає необхідність оцінити середню невизначеність аналізу цієї речовини по всіх лабораторіях. У цьому разі не зовсім коректно будь-яким чином усереднювати довірчі інтервали $\Delta_{\bar{x},k}$, оскільки вони залежать від кількості аналізів і теоретично можуть бути одержані як завгодно малими збільшенням числа випробувань. Більш коректно оцінювати міжвибіркове відносне стандартне відхилення. Для цього можуть бути використані співвідношення (1.14b) і (1.15). Слід зазначити, що в цьому разі одержане міжвибіркове відносне стандартне відхилення не є оцінкою якогось «генерального стандартного відхилення», а являє собою просто деяку середню величину.

9.2. ПІДХІД УЕЛЧА — САТЕРТУЕЙТА

У цьому підході дисперсію величини y (s_y^2) розраховують за співвідношенням (9.2), не зважаючи на розходження у ступенях свободи (v_i) величин x_i. Для одержаної дисперсії s_y^2 розраховують деяке «ефективне» число ступенів свободи v_{eff} (яке зазвичай є дробовим), на основі якого потім за таблицями для заданої імовірності інтерполяцією знаходять коефіцієнт Стьюдента. На основі його далі звичайним шляхом розраховують довірчий інтервал величини y (Δ_y).

$$v_{eff} = \frac{s_y^4}{\sum_{i=1}^{n} \frac{\left(\frac{\partial f}{\partial x_i}\right)^4 \times s_{xi}^4}{v_i}}. \qquad (9.12)$$

У фармакопейному аналізі для визначуваної величини y зазвичай виконується рівняння (9.4). У цьому разі в підході Уелча — Сатертуейта співвідношення (9.2) переходить у вираз (9.9), і співвідношення (9.12) набуває більш простого вигляду:

$$v_{eff} = \frac{s_{y,r}^4}{\sum_{i=1}^{n} \frac{s_{xi,r}^4}{v_i}}, \qquad (9.13)$$

де величину $s_{y,r}^4$ розраховують із співвідношення (9.9).

Підхід Уелча — Сатертуейта звичайно дає більш вузькі довірчі інтервали, ніж лінійна модель. Однак він набагато складніший у застосуванні і не дозволяє виділити невизначеність різних етапів (із подальшими рекомендаціями щодо їх мінімізації) так просто, як лінійна модель у формі виразу (9.8). Крім того, на відміну від лінійної моделі, підхід Уелча — Сатертуейта може давати суперечливі результати у тому випадку, коли величини $s_{xi,r}$ рівняння (9.13) мають одночасно дуже малі ($v = 1 - 3$) і дуже великі (безкінечні) ступені свободи.

При прогнозі невизначеності аналізу використовуються генеральні величини (із нескінченним числом ступенів свободи). У цьому разі підхід Уелча — Сатертуейта збігається з лінійною моделлю.

9.3. ПРИКЛАДИ РОЗРАХУНКІВ НЕВИЗНАЧЕНОСТІ ФУНКЦІЇ ДЕКІЛЬКОХ ЗМІННИХ

9.3.1. Розрахунок невизначеності аналізу готового лікарського засобу за допомогою високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ)

У таблетці із середньою масою 0.50 г міститься 0.050 г речовини А. У процесі проведення кількісного визначення методом ВЕРХ наважку m = 0.5052 г порошку розтертих таблеток поміщають у мірну колбу місткістю 50 мл і доводять розчинником до позначки. Паралельно готують розчин порівняння: 0.0508 г стандартного зразка поміщають у мірну колбу місткістю 50 мл і доводять об'єм розчину розчинником до позначки. Поперемінно хроматографують випробовуваний розчин і розчин порівняння, одержуючи по 5 хроматограм кожного розчину. Нижче наведені площі одержаних піків.

9.3.1.1. Кінцева аналітична операція

Розраховують середні значення, вміст речовини *A* в одній таблетці і відносні стандартні відхилення площ піків для випробовуваного розчину і розчину порівняння в кінцевій аналітичній операції.

а) Середні значення площ піків:

Випробовуваний розчин: (13957605 + 13806804 + 13924245 + 13715195 + 14059478) / 5 = 13892665.

Таблиця 9.1

	Площі піків (S і S_{st}) для хроматограм				
	1	2	3	4	5
Випробовуваний розчин	13957605	13806804	13924245	13715195	14059478
Розчин порівняння	14240777	14102192	14316388	14205217	14409585

Розчин порівняння: (14240777 + 14102192 + 14316388 + 14205217 + 14409585) / 5 = 14254832.

b) Вміст аналізованої речовини А, у грамах, у перерахунку на середню масу таблетки:

$$X = \frac{S \times m_{st} \times 50 \times 0.5}{S^{st} \times m \times 50} =$$

$$= \frac{13892665 \times 0.0508 \times 50}{14254832 \times 0.5052 \times 50} \times 0.5 = 0.0490 .$$

c) Відносні стандартні відхилення площ піків:

Випробовуваний розчин:

$$RSD = \frac{100}{13892665} \times \sqrt{\frac{\begin{array}{l}(13957605 - 13892665)^2 + \\ (13806804 - 13892665)^2 + \\ +(13924245 - 13892665)^2 + \\ (13715195 - 13892665)^2 + \\ (14059478 - 13892665)^2\end{array}}{4}} =$$

$$= 0.97\ \%.$$

Аналогічно для *розчину порівняння*:

$$RSD^{st} = 0.81\ \%.$$

9.3.1.2. Сумарна невизначеність пробопідготовки $\Delta_{SP,r}$

Відповідно до загальної статті 5.*3.N.2«Валідація аналітичних методик і випробувань»*, невизначеності не мають перевищувати для:

— мірної колби місткістю 50 мл — 0.17 %;
— зважування на аналітичних вагах — 0.2 мг (0.0002 г), що становить:
— $100 \times 0.0002/0.5052 = 0.04\ \%$ для випробовуваного зразка;
— $100 \times 0.0002/0.0508 = 0.39\ \%$ для стандартного зразка.

Дані невизначеності можна вважати довірчими інтервалами для ймовірності 95 %.

Сумарну невизначеність пробопідготовки обчислюють за формулою (9.5):

$$\Delta_{SP,r} = \sqrt{(0.04^2 + 0.39^2) + (0.17^2 + 0.17^2)} = 0.46\ \%.$$

Відзначимо, що такий розрахунок є коректним для обох підходів — лінійної моделі та підходу Уелча — Сатертуейта: оскільки число ступенів свободи для кожного члена тут нескінченне, використовується статистика Гауса.

9.3.1.3. Розрахунок сумарної невизначеності аналізу $\Delta_{As,r}$

Даний розрахунок відрізняється для лінійної моделі та підходу Уелча — Сатертуейта.

а) Лінійна модель

Загальний випадок. Розраховують невизначеність кінцевої аналітичної операції $\Delta_{FAO,r}$ для випробовуваного розчину та розчину порівняння. При розрахунку довірчих інтервалів використовують однобічний коефіцієнт Стьюдента для ймовірності 95 % (= 90 % для двобічного розподілу), що для числа ступенів свободи 5 – 1 = 4 дорівнює 2.13. Довірчі інтервали розраховують для середнього із 5 результатів, тому в знаменнику маємо √5:

$$\Delta_{FAO,r}^{smp} = \frac{1}{\sqrt{5}} \times t(90\%, 4) \times RSD =$$

$$= \frac{1}{\sqrt{5}} \times 2.13 \times 0.97 = 0.92\ \%,$$

$$\Delta_{FAO,r}^{st} = \frac{1}{\sqrt{5}} \times t(90\%, 4) \times RSD_{st} =$$

$$= \frac{1}{\sqrt{5}} \times 2.13 \times 0.81 = 0.77\ \%.$$

Сумарна невизначеність кінцевої аналітичної операції:

$$\Delta_{FAO,r} = \sqrt{(\Delta_{FAO}^{smp})^2 + (\Delta_{FAO}^{st})^2} =$$

$$= \sqrt{(0.92)^2 + (0.77)^2} = 1.20\ \%.$$

Використовуючи рівняння (9.8), розраховують сумарну невизначеність аналізу $\Delta_{As,r}$:

$$\Delta_{As,r} = \sqrt{0.46^2 + 1.20^2} = 1.29\ \%.$$

Використання об'єднаного стандартного відхилення. Сумарну невизначеність аналізу можна зменшити за рахунок використання об'єднаного стандартного відхилення для кінцевої аналітичної операції. Для цього слід врахувати, що RSD_{smp} і RSD_{st} зазвичай є вибірковими величинами тієї самої генеральної сукупності.

Перевіряють спочатку із використанням критерію Фішера (див. розділ 2.1) гіпотезу про рівність дисперсій:

$$\frac{RSD_{smp}^2}{RSD_{st}^2} = \frac{0.97^2}{0.81^2} = 1.434 < 6.388 = F(P_1 = 95\ \%; 4; 4).$$

Як видно, розраховане значення відношення дисперсій значно нижче табличного значення *F*-критерію на 95 % рівні значущості. Тому можна прийняти гіпотезу про рівність дис-

персій і використати формули розділу 1.3 для об'єднання вибірок.

Розраховують об'єднане стандартне відхилення за рівнянням (1.14b):

$$RSD_p = \sqrt{[(0.97)^2 + (0.81)^2]/2} = 0.89\ \%.$$

Згідно з рівнянням (1.15), RSD_p має число ступенів свободи $2 \times (5 - 1) = 8$. Коефіцієнт Стьюдента для даного числа ступенів свободи й однобічної імовірності 0.95 дорівнює 1.86.

Тоді довірчі інтервали невизначеності кінцевої аналітичної операції для випробовуваного і стандартного розчинів будуть рівними:

$$\Delta^{smp}_{FAO,r} = \Delta^{st}_{FAO,r} = \frac{1}{\sqrt{5}} \times t(90\ \%; 8) \times$$

$$\times\ RSD = \frac{1}{\sqrt{5}} \times 1.86 \times 0.89 = 0.74\ \%.$$

Сумарна невизначеність кінцевої аналітичної операції дорівнює:

$$\Delta_{FAO,r} = \sqrt{(\Delta^{smp}_{FAO})^2 + (\Delta^{st}_{FAO})^2} =$$

$$= \sqrt{(0.74)^2 + (0.74)^2} = 1.05\ \%.$$

Використовуючи рівняння (9.8), обчислюють сумарну невизначеність аналізу $\Delta_{As,r}$:

$$\Delta_{As,r} = \sqrt{0.46^2 + 1.05^2} = 1.15\ \%.$$

Як бачимо, дана величина (1.15 %) менша за одержану для звичайного випадку (1.29 %).

b) Підхід Уелча — Сатертуейта

Знаходять стандартне відхилення пробопідготовки з довірчого інтервалу $\Delta_{SP,r} = 0.46$ % (див. п. 9.3.1.1), використовуючи коефіцієнт Гауса 1.65 для однобічної імовірності 0.95 (оскільки число ступенів свободи нескінченне — як для генеральної сукупності):

$$s_{sp,r} = 0.46/1.65 = 0.28\ \%.$$

Із співвідношення (9.9) знаходять стандартне відхилення всієї аналітичної методики (величини RSD^2 і $(RSD^{st})^2$ ділять на 5 як для дисперсій середнього результату.

$$s_{As,r} = \sqrt{s^2_{SP,r} + \frac{1}{5}[RSD^2 + (RSD^{st})^2]} =$$

$$= \sqrt{0.28^2 + \frac{1}{5} \times (0.97^2 + 0.81^2)} = 0.63.$$

Знаходять ефективне число ступенів свободи ν_{eff}. При цьому для RSD і RSD^{st} число ступенів свободи дорівнює $5 - 1 = 4$, а для $s_{sp,r}$ — нескінченність.

$$\nu_{eff} = \frac{s^4_{As,r}}{\frac{s^4_{SP,r}}{\infty} + \frac{RSD^4}{5^2 \times 4} + \frac{(RSD^{st})^4}{5^2 \times 4}} =$$

$$\frac{0.63^4}{0 + \frac{1}{100} \times (0.97^4 + 0.81^4)} = 12.0.$$

За Табл. 10.2 знаходять коефіцієнт Стьюдента для числа ступенів свободи 12.0 і однобічної імовірності 0.95. Це 1.78. Тоді довірчий інтервал всієї аналітичної методики становить:

$$\Delta_{As,r} = 1.78 \times 0.63 = 1.12\ \%.$$

Як бачимо, довірчий інтервал, розрахований за підходом Уелча — Сатертуейта (1.12 %), дещо вужчий, ніж для звичайного випадку лінійної моделі (1.29 %), і практично співпадає при використанні об'єднаного стандартного відхилення (1.15 %).

9.3.2. Прогноз невизначеності спектрофотометричного аналізу готового лікарського засобу

За таких прогнозів завжди використовуються генеральні величини, тому застосовується статистика Гауса. Зазвичай використовується коефіцієнт Гауса 1.65 для однобічної імовірності 0.95.

При проведенні спектрофотометричного кількісного визначення готового лікарського засобу (ГЛС) беруть номінальні наважки близько $m = 0.50$ г (ГЛС) і близько $m_{st} = 0.050$ г (стандартний зразок). Використовують однакові розведення для випробовуваного розчину і розчину порівняння: наважка → 50 мл (мірна колба); 1 мл (піпетка) одержаного розчину → 100 мл (мірна колба). Спектрофотометрична невизначеність оптичної густини (за паспортом приладу) $s_r = 0.2$ %, кюветна невизначеність (експериментально знайдена) $s_{cell,r} = 0.1$ %. Передбачається, що буде проводитися 3-разове вимірювання оптичної густини випробовуваного розчину та розчину порівняння з вийманням кювети. Слід провести прогноз невизначеності аналізу.

1) Спочатку знаходять невизначеність пробопідготовки. Згідно із загальною статтею *5.3.N.2* «*Валідація аналітичних методик і випробувань*» невизначеності не мають перевищувати для:

- зважування на аналітичних вагах — 0.2 мг (0.0002 г), що становить $100 \times 0.0002/0.5 = 0.04$ % для випробовуваного зразка і $100 \times 0.0002/0.050 = 0.40$ % для стандартного зразка;
- мірної колби місткістю 50 мл — 0.17 %;
- мірної колби місткістю 100 мл — 0.12 %;

— піпетки місткістю 1 мл — 0.6 %.

Повна невизначеність пробопідготовки становить (із урахуванням випробовуваного розчину та розчину порівняння):

$$\Delta_{SP,r} = \sqrt{\begin{matrix}(0.04^2 + 0.40^2) + (0.17^2 + 0.17^2) + \\ +(0.12^2 + 0.12^2) + (0.6^2 + 0.6^2)\end{matrix}} = 0.98\,\%.$$

Отже, основний внесок у невизначеність пробопідготовки дає піпетка малого об'єму (0.6 %) і мала наважка 0.05 г (0.4 %).

2) Знаходять невизначеність кінцевої аналітичної операції (спектрофотометрії). Коефіцієнт 2 враховує наявність випробовуваного розчину і розчину порівняння:

$$\Delta_{FAO,r} = 1.65 \times \sqrt{\frac{2 \times (s^2_{A,r} + s^2_{cell,r})}{3}} =$$

$$= 1.65 \times \sqrt{\frac{2 \times (0.2^2 + 0.1^2)}{3}} = 0.30\,\%.$$

3) Обчислюють за формулою (9.8) повну прогнозовану невизначеність аналізу:

$$\Delta_{As,r} = \sqrt{0.98^2 + 0.30^2} = 1.03\,\%.$$

Як бачимо, основний внесок у повну невизначеність аналізу дає пробопідготовка (0.98 %).

9.3.3. Розрахунок середнього значення декількох нерівноточних вибірок

У результаті міжлабораторного експерименту отримані такі результати кількісного аналізу якогось готового лікарського засобу (Табл. 9.2).

Яке середнє значення вмісту діючої речовини має лікарський засіб за даними міжлабораторного експерименту?

Результати аналізу в різних лабораторіях не можна вважати вибірками з однієї генеральної сукупності, навіть якщо вони отримані з використанням одного методу, наприклад ВЕРХ. Це пов'язано з тим, що метрологічні характеристики приладів у різних лабораторіях різні. Зокрема, хроматографи можуть мати істотно різні генеральні дисперсії збіжності хроматографічного сигналу, пов'язані як із приладовими факторами, так і з відмінностями колонок і умов аналізу. Тому рівняння (1.16) тут не застосовне. Не застосовне і рівняння (9.11) — число ступенів свободи, як правило, невелике і неоднакове. Тому застосовують співвідношення (9.10):

$$\bar{x} = \frac{\begin{matrix}\frac{10.8}{0.32^2} + \frac{10.6}{0.21^2} + \frac{11.2}{0.65^2} + \frac{11.1}{0.45^2} + \frac{10.9}{0.25^2} + \\ + \frac{11.1}{0.32^2} + \frac{10.5}{0.19^2} + \frac{10.8}{0.34^2} + \frac{11.0}{0.42^2} + \frac{11.2}{0.58^2}\end{matrix}}{\begin{matrix}\frac{1}{0.32^2} + \frac{1}{0.21^2} + \frac{1}{0.65^2} + \frac{1}{0.45^2} + \frac{1}{0.25^2} + \\ + \frac{1}{0.32^2} + \frac{1}{0.19^2} + \frac{1}{0.34^2} + \frac{1}{0.42^2} + \frac{1}{0.58^2}\end{matrix}} = \frac{1189.89}{110.51} = 10.77\,\%.$$

Для порівняння: звичайне (незважене) середнє значення, обчислене за формулою (1.2), становитиме 11.92 %, тобто на 11.92–10.77 = 1.15 % вище.

Відповідно до співвідношення (9.10а), абсолютний довірчий інтервал цього зваженого середнього дорівнює:

$$\Delta_{\bar{x}} = \sqrt{\frac{1}{110.51}} = 0.095\,\%.$$

Як видно, ця величина суттєво менше будь-якого окремого довірчого інтервалу $\Delta_{\bar{x},k}$.

Таблиця 9.2

Лабораторія	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
$\bar{x}_k$ % абс.	10.8	10.6	11.2	11.1	10.9	11.1	10.5	10.8	11.0	11.2
$\Delta_{\bar{x},k}$ % абс.	0.32	0.21	0.65	0.45	0.25	0.32	0.19	0.34	0.42	0.58

10. ДОДАТОК[1]

Таблиця 10.1

Числові значення контрольного критерію $Q(P_1, n)$

n	Q		
	P_1 = 90 %	P_1 = 95 %	P_1 = 99 %
3	0.89	0.94	0.99
4	0.68	0.77	0.89

(1) Большев Л.Н., Смирнов Н.В. Таблицы математической статистики. — М.: Наука, 1983. – 415 с.

5	0.56	0.64	0.76
6	0.48	0.56	0.70
7	0.43	0.51	0.64
8	0.40	0.48	0.58
9	0.38	0.46	0.55

Таблиця 10.2

Числові значення коефіцієнта Стьюдента t(P, v)

	Імовірність P_1 або P_2					
$P_1 \rightarrow$	95 %	97.5 %	99 %	99.5 %	99.9 %	99.95 %
$P_2 \rightarrow$	90 %	95 %	98 %	99 %	99.8 %	99.9 %
Число ступенів свободи $\nu \downarrow$	Значення $t(P, v)$					
1	6.3138	12.7062	31.8205	63.6567	318.31	636.619
2	2.9200	4.3027	6.9646	9.9248	22.3271	31.5991
3	2.3534	3.1824	4.5407	5.8409	10.2145	12.9240
4	2.1318	2.7764	3.7469	4.6041	7.1732	8.6103
5	2.0150	2.5706	3.3649	4.0321	5.8934	6.8688
6	1.9432	2.4469	3.1427	3.7074	5.2076	5.9588
7	1.8946	2.3646	2.9980	3.4995	4.7853	5.4079
8	1.8595	2.3060	2.8965	3.3554	4.5008	5.0413
9	1.8331	2.2622	2.8214	3.2498	4.2968	4.7809
10	1.8125	2.2281	2.7638	3.1693	4.1437	4.5869
11	1.7956	2.2010	2.7181	3.1058	4.0247	4.4370
12	1.7823	2.1788	2.6810	3.0545	3.9296	4.3178
13	1.7709	2.1604	2.6503	3.0123	3.8520	4.2208
14	1.7613	2.1448	2.6245	2.9768	3.7874	4.1405
15	1.7530	2.1314	2.6025	2.9467	3.7328	4.0728
16	1.7459	2.1199	2.5835	2.9208	3.6862	4.0150
17	1.7396	2.1098	2.5669	2.8982	3.6458	3.9651
18	1.7341	2.1009	2.5524	2.8784	3.6105	3.9216
19	1.7291	2.0930	2.5395	2.8609	3.5794	3.8834
20	1.7247	2.0860	2.5280	2.8453	3.5518	3.8495
21	1.7207	2.0796	2.5176	2.8314	3.5272	3.8193
22	1.7171	2.0739	2.5083	2.8188	3.5050	3.7921
23	1.7139	2.0687	2.4999	2.8073	3.4850	3.7676
24	1.7109	2.0639	2.4922	2.7969	3.4668	3.7454
25	1.7081	2.0595	2.4851	2.7874	3.4502	3.7251
26	1.7056	2.0555	2.4786	2.7787	3.4350	3.7066
27	1.7033	2.0518	2.4727	2.7707	3.4210	3.6896
28	1.7011	2.0484	2.4671	2.7633	3.4082	3.6739
29	1.6991	2.0452	2.4620	2.7564	3.3962	3.6594
30	1.6973	2.0423	2.4573	2.7500	3.3852	3.6460
40	1.6839	2.0211	2.4233	2.7045	3.3069	3.5510
50	1.6759	2.0086	2.4033	2.6778	3.2614	3.4960
100	1.6602	1.9840	2.3642	2.6259	3.1737	3.3905
∞	1.6479	1.9647	2.3338	2.5857	3.1066	3.3101

P_1 — імовірність знаходження справжнього значення величини (μ) в інтервалі $\overline{x} - \Delta_x \leq \mu \leq \infty$ або $-\infty \leq \mu \leq \overline{x} + \Delta_x$ (однобічний розподіл).

P_2 — імовірність знаходження справжнього значення величини (μ) в інтервалі $-\Delta_x \leq \mu \leq \overline{x} + \Delta_x$ (двобічний розподіл).

Таблиця 10.3

Відсоткові точки розподілу $\chi^2(P_1, \nu)$

ν	$P_1 = 95\ \%$	$P_1 = 99\ \%$		ν	$P_1 = 95\ \%$	$P_1 = 99\ \%$
1	3.841	6.635		11	19.675	24.725
2	5.991	9.210		12	21.026	26.217
3	7.815	11.345		13	22.362	27.688
4	9.488	13.277		14	23.685	29.141
5	11.070	15.086		15	24.996	30.578
6	12.592	16.812		16	26.296	32.000
7	14.067	18.475		20	31.410	37.566
8	15.507	20.090		25	37.652	44.314
9	16.919	21.666		30	43.773	50.892
10	18.307	23.209		40	55.758	63.691

P_1 — імовірність того, що оцінюване значення χ^2 не перевищує табличне. Це оцінюване значення розглядається як значуще ($P_1 = 95\ \%$) або високозначуще ($P_1 = 99\ \%$).

Стандартизація лікарських засобів і валідація методик контролю якості

УДК 615.451.35.015.3

Бовтенко В. А., Безуглая Е. П., Столпер Ю. М, Ляпунов Н. А.
Государственное научное учреждение «Научно-технологический комплекс “Институт монокристаллов” НАН Украины», Харьков

Изучение свойств препаратов сальбутамола сульфата в форме дозированных ингаляторов под давлением

Показано, что в препаратах сальбутамола сульфата в форме дозированных ингаляторов под давлением концентрация этанола и содержание в нем воды, а также диаметр выходного отверстия и конструкция насадки-ингалятора являются значимыми фармацевтическими факторами для дозы мелкодисперсных частиц (ДМДЧ) и профиля осаждения сальбутамола, определяемых на приборах A, C, D и E в соответствии с общей статьёй *2.9.18* Государственной Фармакопеи Украины (ГФУ). Для разработанного препарата *Сальбутамол, аэрозоль для ингаляции дозированный 100 мкг/доза* и препарата *Сальбутамол-Тева, аэрозоль для ингаляции дозированный 100 мкг/доза* проведено сравнительное определение размеров частиц сальбутамола сульфата методом лазерной дифракции и аэродинамических свойств на приборах A, C, D и E методом жидкостной хроматографии. Установлена эквивалентность *in vitro* этих препаратов по таким характеристикам, как доставляемая доза, ДМДЧ (респирабельная фракция), распределение частиц по размерам, относительные количества сальбутамола, прошедшие каждый уровень приборов D и E, средний аэродинамический диаметр массы (MMAD) и геометрическое стандартное отклонение (GSD). Показано, что респирабельные фракции сальбутамола, определяемые для конкретного препарата на приборах A, C и D, сопоставимы между собой; прибор A целесообразно использовать для рутинного контроля ДМДЧ, а приборы D и E — для контроля нескольких фракций частиц, определения распределения частиц по размерам, а также MMAD и GSD.

Ключевые слова: сальбутамол, аэрозоль для ингаляции дозированный, импинджер, импактор, доза мелкодисперсных частиц, распределение частиц по размерам, средний аэродинамический диаметр массы, геометрическое стандартное отклонение, доставляемая доза.

При вдыхании аэрозолей для ингаляций оседание аэрозольных частиц в разных отделах дыхательного тракта зависит от их размера и коррелирует с оседанием частиц на разных ступенях прибора D [1-3]. Фракции частиц с размером более 5.8 мкм оседают во рту, что соответствует оседанию на L-образной трубке (пресепараторе), ступенях 0 и 1 прибора D; фракция с размером частиц от 4.7 мкм до 5.8 мкм оседает в глотке, что соответствует ступени 2. Эти фракции проглатываются и не достигают своих мишеней в нижней части легких. Фракции с размером частиц от 3.3 мкм до 4.7 мкм оседают в трахее и первичных бронхах, что соответствует ступени 3; фракции с размером частиц от 2.1 мкм до 3.3 мкм оседают во вторичных бронхах, что соответствует ступени 4; фракции с размером частиц от 1.1 мкм до 2.1 мкм оседают в терминальных бронхах, что соответствует ступени 5; фракции с размером частиц от 0.65 мкм до 1.1 мкм и от 0.43 мкм до 0.65 мкм оседают в альвеолах и соответствуют оседанию частиц соответственно на ступенях 6 и 7. На фильтре (ступень 8) оседают частицы с диаметром менее 0.4 мкм [2, 3].

Поскольку терапевтическое действие зависит от размера частиц аэрозолей, в руководстве СТ-Н МОЗУ 42-38:2013 «Лікарські засоби. Фармацевтична якість препаратів для інгаляції та назальних препаратів» [4] указано, что при фармацевтической разработке препаратов для ингаляции в форме дозированных ингаляторов под давлением необходимо исследовать количество мелкодисперсных частиц (респирабельную фракцию) в одной дозе и распределение частиц/капель по размерам. В спецификации следует нормировать количество мелкодисперсных частиц, которые следует определять по валидированной методике на многоуровневом импакторе или импинджере, либо с помощью надлежащим образом валидированного альтернативного метода, например, с использованием двухкамерного стеклянного импинджера (прибора A), рекомендовавшегося в ряде монографий Британской Фармакопеи [5]. Считается, что приемлемо устанавливать верхний и нижний пределы для суммарного содержания лекарственного вещества, осевшего на нескольких ступенях и соответствующего частицам с размерами менее 5 мкм; при достаточном обосновании могут быть приемлемы альтернативные пределы, например, только нижний предел [5]. Если определения одного количества мелкодисперсных частиц недостаточно для более полной характеристики распределения частиц по размерам в терапевтической дозе, могут быть установлены дополнительные критерии приемлемости, например, пределы для средне-

го аэродинамического диаметра массы (mass median aerodynamic diameter — MMAD) и геометрического стандартного отклонения (geometrical standard deviation — GSD) [4]. Может быть стандартизовано распределение частиц с размерами более 5 мкм, если эта нереспирабельная фракция значима для терапевтического индекса препарата.

В случае сокращенного регистрационного досье на препарат-генерик в форме ингаляции под давлением, которое не содержит результатов клинических испытаний, для оценки его эквивалентности относительно референтного препарата считают приемлемым использование данных сравнительных исследований *in vitro*, полученных с использованием многоступенчатого импактора/импинджера (при условии, если разработанный препарат-генерик соответствует другим установленным критериям относительно референтного препарата) [6]. Следует привести данные о полном профиле распределения частиц по размерам на отдельных ступенях многоступенчатого прибора с использованием валидированного метода. Эффективность и безопасность лекарственного препарата зависит от количества действующего вещества, достигающего легких, и от его распределения на местах осаждения. Кроме того, безопасность будет зависеть от скорости и степени системной абсорбции из желудочно-кишечного тракта глотаемых фракций, которые оседают на верхних ступенях импакторов или импинджера. Сравнение следует провести для каждой ступени прибора или обоснованной группы ступеней. Как минимум, предполагается 4 группы ступеней. Обоснование должно основываться на ожидаемых местах осаждения в легких. Допустимой и обоснованной разницей при исследованиях *in vitro* считается ± 15 %. На основании соответствия критериям приемлемости может быть сделано заключение об эквивалентности [6].

В Государственной Фармакопее Украины (ГФУ) [1] описаны 4 разных прибора для аэродинамического определения мелкодисперсных частиц: прибор А (двухкамерный стеклянный импинджер), прибор С (многоступенчатый жидкостный импинджер с пресепаратором и 4 ступенями), прибор D (каскадный импактор Андерсена с пресепаратором и 8 ступенями) и прибор Е (каскадный импактор с пресепаратором, 7 ступенями и сборником с микроотверстиями — МОС). Как следует из Табл. 1, оценка количества мелкодисперсных частиц и их распределения по размерам при использовании разных приборов может быть неоднозначной, что требует научно обоснованного выбора приборов для фармацевтической разработки и для рутинного анализа дозированных препаратов для ингаляции под давлением (дозированных аэрозолей для ингаляций).

При разработке препарата-генерика маловероятна возможность использования дозирующего клапана и насадки-ингалятора, которыми комплектуют референтный препарат. Маловероятно также использование микронизированного лекарственного вещества от того же производителя, который поставляет его для производства референтного препарата. Поэтому важно определить значимые фармацевтические факторы, позволяющие управлять дозой мелкодисперсных частиц (ДМДЧ) и распределением частиц по размерам, и разработать препарат для ингаляции под давлением, эквивалентный *in vitro* референтному препарату.

Цель данной работы — исследовать влияние различных факторов на ДМДЧ и распределение частиц по размерам препаратов сальбутамола

Таблица 1

Распределение частиц по размерам (D) на ступенях разных приборов [1]

Прибор А		Прибор С		Прибор D		Прибор Е	
№ ступени	D, мкм	№ ступени	D, мкм	№ ступени	D, мкм	№ ступени	D, мкм
1	> 5	1	—	0	> 9.0	1	> 11.72
2	≤ 5	2	> 9.62	1	5.8 – 9.0	2	6.40 – 11.72
		3	4.38 – 9.62	2	4.7 – 5.8	3	3.99 – 6.40
		4	2.40 – 4.38	3	3.3 – 4.7	4	2.30 – 3.99
		5 (фильтр)	≤ 2.40	4	2.1 – 3.3	5	1.36 – 2.30
				5	1.1 – 2.1	6	0.83 – 1.36
				6	0.7 – 1.1	7	0.54 – 0.83
				7	0.4 – 0.7	8 (МОС)	≤ 0.54
				8 (фильтр)	≤ 0.4		

сульфата в форме дозированных аэрозолей для ингаляций 100 мкг/доза, используя в качестве критерия приемлемости аэродинамические характеристики препарата *Сальбутамол-Тева, аэрозоль для ингаляций дозированный 100 мкг/доза*.

Объекты и методы

В качестве объектов исследований использовали образцы инновационного препарата *Сальбутамол-Тева, аэрозоль для ингаляций дозированный 100 мкг/доза* (с. AET46A) (далее *Сальбутамол-Тева, аэрозоль*) [7] и разработанного нами препарата-генерика *Сальбутамол, аэрозоль для ингаляций дозированный 100 мкг/доза* (далее *Сальбутамол, аэрозоль*). Оба препарата содержат сальбутамола сульфат микронизированный в виде суспензии в количестве 100 мкг в номинальной дозе (в пересчете на 100 % сухое вещество сальбутамол), этанол и пропеллент норфлуран (1.1.1.2-тетрафторэтан, HFC 134a) [8]. При фармацевтической разработке использовали этанол (96 %) и этанол безводный [8], варьируя содержание этанола в препарате и контролируя ДМДЧ на приборе А [1]. В препарате сравнения как компонент первичной упаковки используют клапан с объемом дозирующей камеры около 28 мкл, а в препарате-генерике — 25 мкл. Для исследований препарат-генерик комплектовали отличающимися по конструкции насадками-ингаляторами двух фирм-производителей (далее — фирма 1 и фирма 2); диаметры выходного отверстия (сопла) насадки-ингалятора фирмы 1 составляли 0.25 мм и 0.35 мм, а фирмы 2 — 0.25 мм и 0.30 мм.

Распределение частиц по размерам сальбутамола сульфата микронизированного, который находится в баллонах с препаратом, определяли методом лазерной дифракции с помощью лазерного дифракционного анализатора частиц «Shimadzu SALD-2201» («Shimadzu», Япония) [8]. Для испытания три дозы референтного препарата или препарата-генерика выпускали из баллона под поверхность этанола безводного, в котором сальбутамола сульфат практически не растворим (1:11000, 91 мкг/мл при температуре 25 °С) [8].

Количественное определение сальбутамола проводили на хроматографе Shimadzu LC20 в следующей комплектации: УФ-детектор SPD20-AV, термостат CTO-20AC, автосамплер SIL-20A, насосы, дегазатор DGU-20A3R, контроллер CBM-20A Lite, — по разработанной и валидированной нами методике [9].

Распределение частиц по размерам и/или дозу мелкодисперсных частиц (ДМДЧ) определяли по методологии, изложенной в общей статье *2.9.18* ГФУ с использованием приборов A, C, D и E [1]. Ламинарный поток воздуха создавали вакуумным насосом ERWEKA Vacuum Pump Type VP 1000, а скорость потока воздуха устанавливали при помощи измерителя скорости потока DFM 2.

Величины MMAD рассчитывали в соответствии с определением в руководстве СТ-Н МОЗУ 42-3.8:2013 [4] по графикам зависимости относительного количества сальбутамола (относительно величины осажденной суммарной фракции), прошедшего ступени многоуровневых приборов, от максимального размера частиц, осевших на этих ступенях (Рис. 7 и 8) [1, 10]. Значения GSD рассчитывали по этим же графикам (Рис. 7 и 8) как корень квадратный отношения диаметра частиц, соответствующих 84.13 % от суммарной фракции сальбутамола, к диаметру частиц, соответствующих 15.87 % от суммарной фракции сальбутамола, по формуле [1]:

$$GSD = (D84.13\% / D15.87\ \%)^{1/2}.$$

Среднюю доставляемую дозу определяли по фармакопейной методике [11] с использованием дозировочного устройства ERWEKA DUSA-MDI, вакуумного насоса ERWEKA HVP 1000 и расходомера типа DMF 2 («Erweka», Германия).

Определяли статические отпечатки факела распыления, которые характеризуются внутренним диаметром (диаметром плотного участка факела) (d), и внешним диаметром (диаметром разброса во внешней зоне) (D) [10].

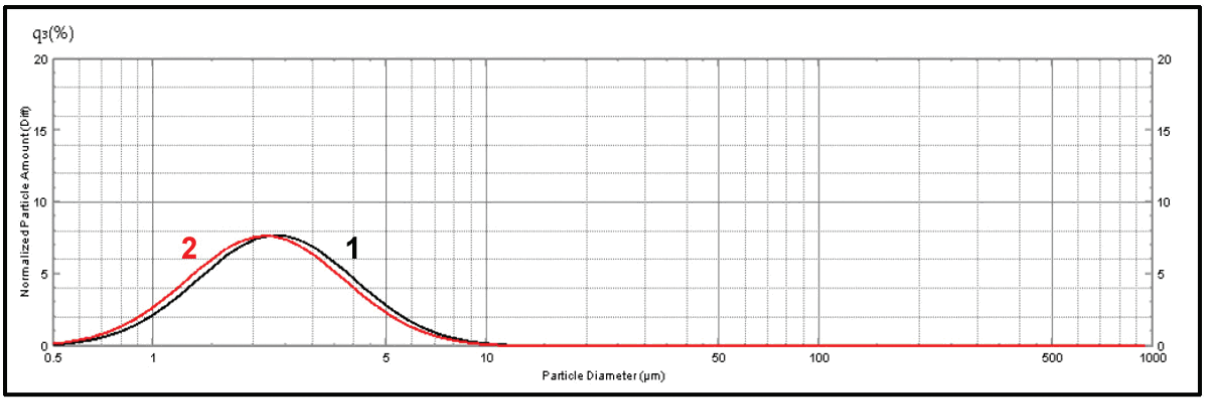
Результаты исследований и их обсуждение

На Рис. 1 представлены результаты определения средних размеров частиц сальбутамола сульфата и распределение частиц по размерам в двух исследованных препаратах *Сальбутамол, аэрозоль* и *Сальбутамол-Тева, аэрозоль*.

Как видно из Рис. 1, 50 % частиц сальбутамола сульфата в препарате *Сальбутамол, аэрозоль* имели размер 2.332 мкм, а в препарате *Сальбутамол-Тева, аэрозоль* — 2.167 мкм; при этом более 90 % частиц относились к респирабельной фракции. Средние размеры частиц сальбутамола сульфата и их распределение по размерам в обоих препаратах практически идентичны, поэтому этот фармацевтический фактор не мог существенно повлиять на различия в ДМДЧ и осаждении частиц сальбутамола в импинджерах и импакторах для сравниваемых препаратов.

Перед исследованием ДМДЧ на приборе А определяли баланс масс (Табл. 2), который свидетельствует о гарантии достоверности результатов [1].

Рисунок 1



	File Name	Sample ID	Sample No.	Median D(μm)	Modal D(μm)	Mean V(μm)	Std Dev	Ref Index
1	Сальбутамол-ФС ВЧ			2.332	2.239	2.333	0.234	1.70-0.20i
2	Сальбутамол Тева			2.167	2.239	2.166	0.235	1.70-0.20i

	10 %D(μm)	20 %D(μm)	30 %D(μm)	40 %D(μm)	50 %D(μm)	60 %D(μm)	70 %D(μm)	80 %D(μm)	90 %D(μm)
1	1.161	1.475	1.752	2.037	2.332	2.680	3.093	3.690	4.687
2	1.073	1.365	1.630	1.885	2.167	2.482	2.888	3.437	4.376

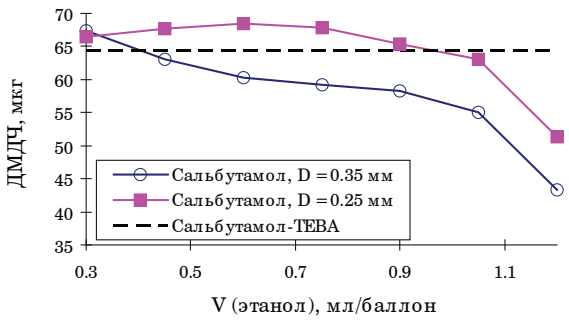
Распределение частиц сальбутамола сульфата по размерам в препаратах *Сальбутамол, аэрозоль* (1) и *Сальбутамол-Тева, аэрозоль* (2)

При определении баланса масс суммарное количество сальбутамола в двух камерах должно быть от 75 % до 125 % от средней доставляемой дозы [1]. Для препарата *Сальбутамол, аэрозоль*, укомплектованного насадкой-ингалятором фирмы 1 с диаметром сопла 0.25 мм, средняя доставляемая доза сальбутамола составила 85.47 мкг при относительном стандартном отклонении (RSD) 6.79 %. Суммарное количество сальбутамола, осевшего в двух камерах прибора А, в пересчете на одну дозу, в среднем составило 87.54 мкг или 102.43 % от средней доставляемой дозы (Табл. 2), что удовлетворяет критериям приемлемости [1].

Для препарата сравнения средняя доставляемая доза сальбутамола составила 86.89 мкг при RSD = 6.30 %. Ее относительное отличие от средней доставляемой дозы сальбутамола разработанного препарата равно 1.6 %, что меньше допускаемых при определении эквивалентности *in vitro* различий (± 15 %) [6].

Состав вспомогательных веществ и насадку-ингалятор для препарата-генерика выбирали по результатам определения ДМДЧ на приборе А (Рис. 2).

Рисунок 2



Зависимость величин ДМДЧ сальбутамола, определенных на приборе А, от объема (V) этанола безводного в препарате при разных диаметрах (D) выходного отверстия насадок-ингаляторов фирмы 1

Таблица 2

Баланс масс при определении ДМДЧ сальбутамола на приборе А для препарата *Сальбутамол, аэрозоль*

Номер пробы	Содержание сальбутамола			
	Нижняя камера, мкг	Верхняя камера, мкг	Суммарное содержание в двух камерах, мкг	% от СДД*
1	71.51	22.33	93.84	109.79
2	67.85	17.41	85.26	99.75
3	66.10	17.43	83.53	97.73
Среднее	68.49	19.06	87.54	102.43

Примечание. *Средняя доставляемая доза (СДД) составляет 85.47 мкг.

Как следует из Рис. 2, при использовании насадки-ингалятора с диаметром выходного отверстия 0.25 мм в определенном интервале содержания этанола безводного респирабельная фракция, определяемая в нижней камере прибора А, оказывается близкой к ДМДЧ референтного препарата и проходит через максимум при содержании этанола безводного 0.6 мл/баллон. При более высоком содержании этанола безводного респирабельная фракция уменьшается и становится тем меньше, чем больше содержание этанола безводного.

Средняя величина ДМДЧ в нижней камере прибора А для препарата *Сальбутамол-Тева, аэрозоль* составила 64.52 мкг, что приблизительно соответствует респирабельной фракции 68.50 мкг препарата *Сальбутамол, аэрозоль*; различие составляет всего 6.17 % при критерии приемлемости ± 15 % [6].

В интервалах содержания этанола безводного от 0.45 мл до 1.20 мл на баллон ДМДЧ оказывается больше при использовании насадки-ингалятора с диаметром выходного отверстия 0.25 мм. При использовании насадки-ингалятора с диаметром выходного отверстия 0.35 мм с увеличением содержания этанола безводного от 0.30 мл до 1.05 мл на баллон респирабельная фракция сальбутамола плавно уменьшается и резко снижается при увеличении содержания этанола до 1.20 мл на баллон. При этом в интервалах содержания этанола безводного от 0.6 мл до 1.2 мл на баллон ДМДЧ оказывается меньше, чем у препарата *Сальбутамол-Тева, аэрозоль*.

При содержании этанола (96 %) 0.6 мл/баллон и использовании насадок-ингаляторов с D = 0.25 мм и D = 0.35 мм респирабельные фракции сальбутамола составили 57.1 % и 46.0 % от номинальной дозы 100 мкг, что оказывается меньше, чем при использовании этанола безводного в 1.2 и 1.3 раза соответственно. Увеличение диаметра выходного отверстия с 0.25 мм до 0.35 мм при использовании в составе препарата 0.6 мл этанола безводного приводит к уменьшению ДМДЧ с 68.5 мкг до 60.3 мкг, то есть на 12 %.

Таким образом, концентрация этанола в препарате и содержание в нем воды, а также диаметр выходного отверстия насадки-ингалятора являются значимыми фармацевтическими факторами для ДМДЧ аэрозолей сальбутамола.

Прибор А имеет 2 камеры, поэтому он подходит для определения суммарной ДМДЧ, но не распределения частиц по размерам, для чего следует использовать многоступенчатые приборы. Как следует из Табл. 1, мелкодисперсные частицы, имеющие размеры ≤ 5 мкм, в случае многоступенчатых приборов частично осаждаются на одной из ступеней вместе с частицами нереспирабельной фракции с размерами ≥ 5 мкм. Для прибора С это ступень 3, для прибора D — ступень 2, а для прибора Е — ступень 3. Это надо учитывать при стандартизации ДМДЧ и выборе прибора для ее рутинного контроля. В данной работе фракции частиц, осевших на указанных ступенях, при расчете ДМДЧ не учитывали.

Прибор С имеет 2 ступени, 4-ю и 5-ю (фильтр), на которых осаждаются мелкодисперсные частицы (Табл. 1). На фильтре осаждаются частицы размером ≤ 2.40 мкм. Как видно из Рис. 1, на

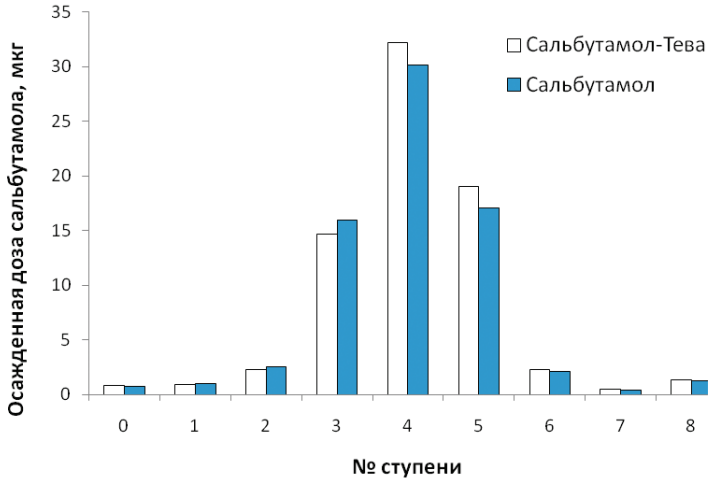
Таблица 3

Осаждение сальбутамола на ступенях прибора D

Номер ступени	Осажденная доза сальбутамола, мкг		Δ, %
	Сальбутамол-Тева аэрозоль	Сальбутамол аэрозоль	
L-образная трубка	23.27	20.08	−13.71
0	0.82	0.74	−9.76
1	0.94	1.01	+7.45
2	2.33	2.54	+9.01
3	14.68	15.97	+8.79
4	32.17	30.17	−6.22
5	19.00	17.11	−9.95
6	2.34	2.11	−9.83
7	0.49	0.43	−12.24
8 (фильтр)	1.38	1.32	−4.35
Суммарная фракция	**97.42**	**91.48**	**− 6.10**
Суммарная фракция со ступеней 3-8 (ДМДЧ)	**70.06**	**67.11**	**−4.21**

Примечание. В этой таблице и далее Δ — это различие между значениями для препарата сравнения и разработанного препарата.

Рисунок 3



Профили осаждения сальбутамола на ступенях прибора D (по данным Табл. 3)

Таблица 4

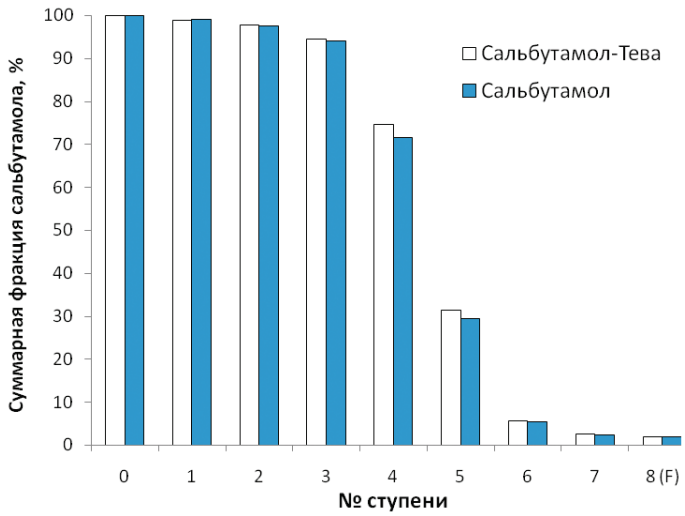
Суммарные фракции сальбутамола, прошедшие ступени 0-8 прибора D

Номер ступени	Эффективный диаметр частиц, мкм	Суммарная фракция сальбутамола, %	
		Сальбутамол-Тева, аэрозоль	Сальбутамол, аэрозоль
8	0.4	1.86	1.85
7	0.7	2.52	2.45
6	1.1	5.68	5.41
5	2.1	31.30	29.37
4	3.3	74.69	71.63
3	4.7	94.48	94.00
2	5.8	97.63	97.55
1	9.0	98.89	98.96
0		100.00	100.00

Примечания.

1. Расчет в процентах проведен по отношению к суммарной фракции сальбутамола, осевшей на ступенях 0-8. Фракцию, осевшую внутри L-образной трубки, не учитывали.
2. Под номером 8 указано количество сальбутамола в процентах от суммарной фракции, осевшее на ступени 8 (фильтре); под номером 7 — количество, осевшее суммарно на фильтре и ступени 7; под номером 6 — количество, осевшее суммарно на фильтре, ступенях 7 и 6 и т.д.

Рисунок 4



Профили прохождения сальбутамолом ступеней прибора D (по данным Табл. 4)

приборе C нельзя определить распределение частиц по размерам более 50 % частиц сальбутамола сульфата, которые имеют размеры менее 2.40 мкм. Поэтому прибор C подходит только для определения суммарной ДМДЧ, осаждаемой на ступенях 4 и 5, а также, при необходимости, нереспирабельной фракции. Суммарные количества мелкодисперсных частиц на ступенях 4 и 5 прибора C для препарата сравнения и препарата-генерика составили 64.72 мкг и 65.41 мкг соответственно, что превышает критерий приемлемости ≥ 35 мкг, установленный ранее для ДМДЧ сальбутамола в монографии «Salbutamol Pressurised Inhalation» Британской Фармакопеи [5]. Относительное отличие в величине ДМДЧ для препарата сравнения и разработанного препарата составило 1.07 %.

Результаты определения ДМДЧ и распределения частиц по размерам сальбутамола для препарата сравнения и разработанного препарата на приборе D представлены в Табл. 3 и на Рис. 3, а суммарные фракции сальбутамола, прошедшие каждую ступень прибора D — в Табл. 4 и на Рис. 4.

Как следует из Табл. 3, суммарные количества мелкодисперсных частиц на ступенях 3-8 прибора D для препарата *Сальбутамол-Тева, аэрозоль* и препарата *Сальбутамол, аэрозоль* составили 70.06 мкг и 67.11 мкг соответственно, что превышает критерий приемлемости ≥ 35 мкг для ДМДЧ [5]. Относительное отличие респирабельных фракций разработанного препарата и препарата сравнения составило всего лишь −4.21 % при критерии приемлемости ± 15 %.

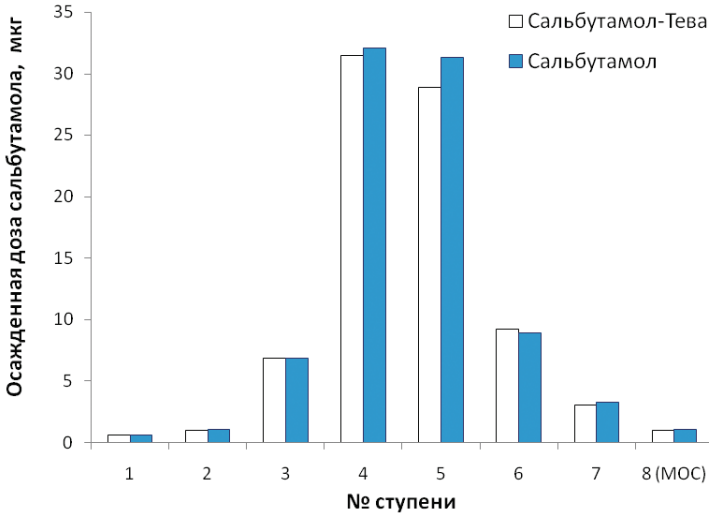
Оба исследованных препарата имеют практически идентичные профили осаждения сальбутамола на ступенях прибора D; наибольшее

Таблица 5

Осаждение сальбутамола на ступенях прибора E

Номер ступени	Осажденная доза сальбутамола, мкг		Δ, %
	Сальбутамол-Тева аэрозоль	Сальбутамол аэрозоль	
L-образная трубка	16.46	14.09	−14.40
1	0.62	0.64	+3.23
2	1.02	1.09	+6.86
3	6.84	6.87	+0.44
4	31.53	32.07	+1.71
5	28.91	31.36	+8.47
6	9.20	8.95	−2.72
7	3.07	3.29	+7.17
8 (МОС)	0.99	1.03	+4.04
Суммарная фракция	**98.64**	**99.39**	**+0.76**
Суммарная фракция со ступеней 4-8 (ДМДЧ)	**73.70**	**76.70**	**+4.07**

Рисунок 5



Профили осаждения сальбутамола на ступенях прибора E (по данным Табл. 5)

количество сальбутамола осаждается на ступенях 3, 4 и 5 (Рис. 3), что соответствует респирабельной фракции с размерами частиц от 4.7 мкм до 1.1 мкм (Табл. 1). Для обоих препаратов осаждение сальбутамола максимально на ступени 4 (Табл. 3, Рис. 3), на которой осаждаются частицы с размерами от 2.1 мкм до 3.3 мкм (Табл. 1). Это в целом согласуется с данными о величине частиц сальбутамола сульфата в препаратах, полученных методом лазерной дифракции (Рис. 1). Для обоих препаратов практически идентичны также профили прохождения сальбутамолом ступеней 0-8 прибора D (Табл. 4, Рис. 4).

Результаты определения ДМДЧ (респирабельной фракции) и распределения частиц по размерам сальбутамола для препаратов *Сальбутамол-Тева, аэрозоль* и *Сальбутамол, аэрозоль* на приборе Е представлены в Табл. 5 и на Рис. 5, а суммарные фракции сальбутамола, прошедшие каждую ступень прибора Е, приведены в Табл. 6 и на Рис. 6.

Как следует из Табл. 5, количество мелкодисперсных частиц, осевшее на ступенях 4-8 прибора Е, для препаратов *Сальбутамол-Тева, аэрозоль* и *Сальбутамол, аэрозоль* составило 73.70 мкг и 76.70 мкг соответственно, что выше нижнего предела 35 мкг для ДМДЧ [5]. Относительное отличие в ДМДЧ этих препаратов составило всего +4.07 %. Оба препарата имеют практически идентичные профили осаждения сальбутамола на ступенях прибора Е; больше всего сальбутамол осаждается на ступенях 4 и 5 (Рис. 5), что соответствует респирабельной фракции с размерами частиц от 3.99 мкм до 1.36 мкм (Табл. 1). Это в целом согласуется с данными о величине частиц сальбутамола сульфата в препаратах, полученных методом лазерной дифракции (Рис. 1). Почти идентичны для обоих препаратов также профили прохождения сальбутамолом ступеней 1-8 прибора Е (Табл. 6, Рис. 6).

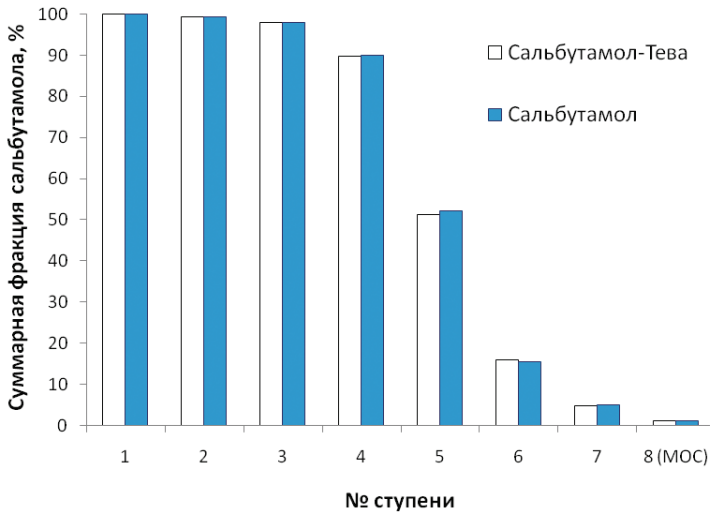
На основании данных, представленных в Табл. 4 и 6, были построены графики зависи-

Таблица 6

Суммарные фракции сальбутамола, прошедшие ступени 1-8 прибора Е

Номер ступени	Эффективный диаметр, мкм	Суммарная фракция сальбутамола, %	
		Сальбутамол-Тева аэрозоль	Сальбутамол аэрозоль
8	0.54	1.20	1.21
7	0.83	4.94	5.06
6	1.36	16.14	15.56
5	2.30	51.31	52.32
4	3.99	89.68	89.92
3	6.40	98.00	97.97
2	11.72	99.25	99.25
1	< 11.72	100.00	100.00

Рисунок 6



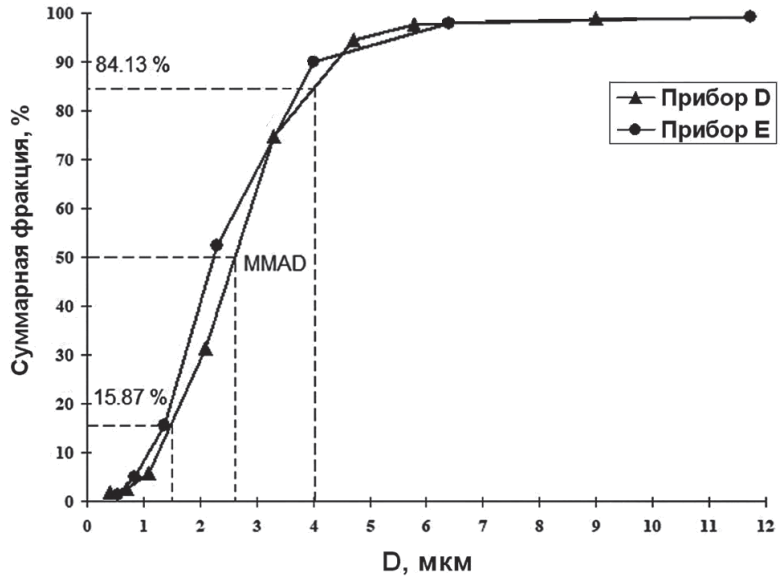
Профили прохождения сальбутамолом ступеней прибора Е (по данным Табл. 6)

Таблица 7

Величины MMAD и GSD для исследованных препаратов

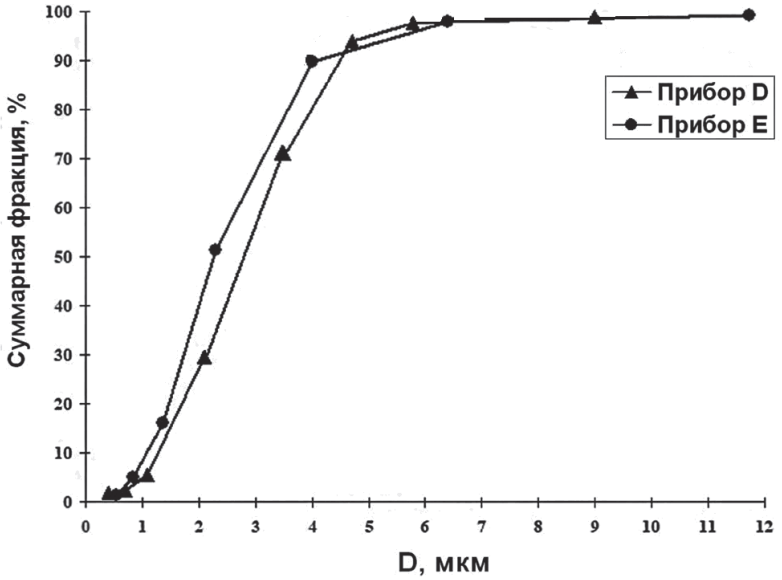
Наименование препарата	MMAD, мкм		GSD, %	
	Прибор D	Прибор E	Прибор D	Прибор E
Сальбутамол-Тева, аэрозоль	2.65	2.24	1.63	1.63
Сальбутамол, аэрозоль	2.70	2.26	1.60	1.67

Рисунок 7



Графики зависимости значений относительного количества сальбутамола (относительно величины осажденной суммарной фракции), прошедшего ступени многоуровневых импакторов D и E, от максимального размера частиц, осажденных на этих ступенях, для препарата *Сальбутамол-Тева, аэрозоль*

Рисунок 8



Графики зависимости значений относительного количества сальбутамола (относительно величины осажденной суммарной фракции), прошедшего ступени многоуровневых импакторов D и E, от максимального размера частиц, осажденных на этих ступенях, для препарата *Сальбутамол, аэрозоль*

мостей значений относительного количества сальбутамола (относительно величины осажденной суммарной фракции), прошедшего ступени многоуровневых приборов D и E, от максимального размера частиц, осажденных на этих ступенях, для препарата *Сальбутамол-Тева, аэрозоль* и препарата *Сальбутамол, аэрозоль*, которые представлены на рисунках 7 и 8.

Величины MMAD и GSD, которые определены для исследованных препаратов по данным Рис. 7 и 8, приведены в Табл. 7.

Как следует из Табл. 7, величины MMAD и GSD, определенные с помощью как прибора D, так и прибора E, практически не отличаются для обоих исследованных препаратов. При определении с помощью разных многоступенчатых импакторов (прибора D и прибора E) величины MMAD для каждого из препаратов мало отличаются друг от друга, а значения GSD оказались практически одинаковы. То есть, эти приборы могут быть взаимозаменяемыми при определении таких аэродинамических параметров, как MMAD и GSD, в то время как многоступенчатый жидкостный импинджер (прибор C) для этих целей неприемлем.

В Табл. 8 обобщены данные о респирабельных фракциях (ДМДЧ) сальбутамола, значения которых определены с помощью разных приборов.

Как следует из Табл. 8, ДМДЧ, определяемые с помощью приборов A, C и D, мало отличаются друг от друга. Максимальное относительное отличие между ДМДЧ, определенными на приборах A и D, для препарата *Сальбутамол-Тева, аэрозоль* составило 8.6 %. С учетом того, что респирабельные фракции составляют 64.52 мкг и 70.06 мкг, а нижний предел равен 35 мкг (35 % от номинальной дозы 100 мкг), это отличие является не значимым. Тем более, что для препарата *Сальбутамол, аэрозоль* относительное отличие ДМДЧ при определении на приборах A и D составило всего 2.0 %. Эти отличия находятся в рамках вариабельности методов определения ДМДЧ. Поэтому для исследованных аэрозолей сальбутамола приборы A, C и D можно считать взаимозаменяемыми для определения суммарной ДМДЧ (респирабельной фракции) сальбутамола. Учитывая большую простоту и экономичность анализов, целесообразно для рутинного определения суммарной ДМДЧ сальбутамола использовать прибор A. Если необходимо нормировать не суммарную ДМДЧ, а количество определенных фракций сальбутамола, то для его определения следует использовать многоступенчатый импактор D или E.

Наибольшие ДМДЧ получены при использовании прибора E. Относительные отличия между ДМДЧ при определении с помощью приборов A и E для препарата *Сальбутамол-Тева, аэрозоль* и препарата *Сальбутамол, аэрозоль* составляют 14.2 % и 12.0 % соответственно. Однако это не исключает использования прибора E для определения количества мелкодисперсных частиц в одной дозе.

При фармацевтической разработке приборы D и E пригодны для определения распределения частиц по размерам, а также таких аэродинамических параметров как MMAD и GSD. Приборы D и E наиболее приемлемы для исследований с целью определения эквивалентности *in vitro* препаратов-генериков и соответствующих референтных препаратов в форме дозированных аэрозолей под давлением. По результатам проведенных исследований разработанный препарат *Сальбутамол, аэрозоль* эквивалентен *in vitro* препарату *Сальбутамол-Тева, аэрозоль*. Это обусловлено соответствием критериям приемлемости не только относительно распределения частиц по размерам и ДМДЧ сальбутамола, но и другим установленным требованиям, в частности, соответствия величин доставляемых доз [6].

Представляло интерес исследование респирабельных фракций и распределения частиц по размерам разработанного препарата с использованием насадок-ингаляторов фирмы 2 с диаметрами выходных отверстий 0.25 мм и 0.30 мм. С указанными насадками-ингаляторами на приборе A были получены величины ДМДЧ 55.73 мкг и 55.26 мкг соответственно, которые практически не отличаются друг от друга.

В Табл. 9 и на Рис. 9 представлены данные об осаждении сальбутамола на ступенях прибора D при использовании в препарате *Сальбутамол, аэрозоль* насадок-ингаляторов фирмы 2, которые имеют разные диаметры выходных отверстий.

Таблица 8

Респирабельные фракции (ДМДЧ) сальбутамола, значения которых определены с помощью приборов A, C, D и E

Препарат	ДМДЧ, мкг			
	Прибор A	Прибор C	Прибор D	Прибор E
Сальбутамол-Тева, аэрозоль	64.52	64.72	70.06	73.70
Сальбутамол, аэрозоль	68.50	65.41	67.11	76.70

Таблица 9

Осаждение сальбутамола (мкг) на ступенях прибора D при использовании в препарате *Сальбутамол аэрозоль* насадок-ингаляторов фирмы 2

Номер ступени	Сальбутамол-Тева, аэрозоль	Сальбутамол, аэрозоль, насадка-ингалятор с D = 0.25 мм		Сальбутамол, аэрозоль, насадка-ингалятор с D = 0.30 мм	
	мкг	мкг	Δ. %	мкг	Δ. %
L-образная трубка	23.27	28.90	+24.19	30.27	+30.08
0	0.82	0.90	+9.76	2.63	+220.73
1	0.94	1.65	+43.03	2.14	+127.66
2	2.33	3.33	+42.92	5.34	+129.18
3	14.68	18.61	+26.77	18.80	+28.07
4	32.17	25.16	−21.79	23.25	−27.73
5	19.00	9.53	−49.84	10.52	−44.63
6	2.34	1.21	−48.29	1.47	−37.18
7	0.49	0.45	−8.16	0.37	−24.49
8 (фильтр)	1.38	1.03	−25.36	1.04	−24.64
Суммарная фракция	97.42	90.77	−7.33	95.83	−1.63
Суммарная фракция со ступеней 3-8 (ДМДЧ)	70.06	55.99	−20.08	55.45	−20.85

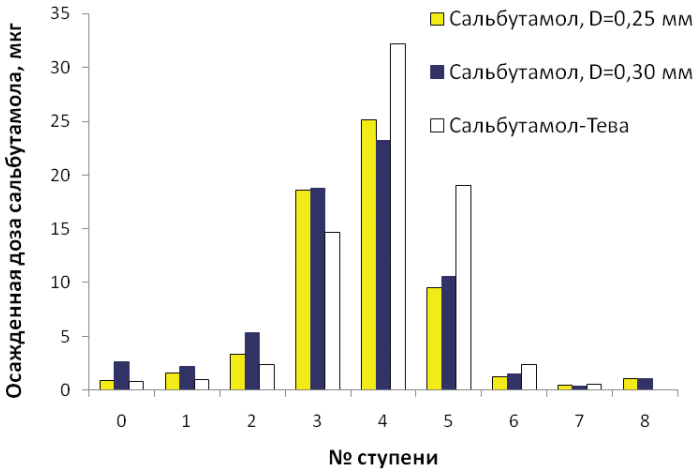
Как следует из Табл. 9, суммарные фракции мелкодисперсных частиц сальбутамола, осажденные на ступенях 3-8, при использовании насадок-ингаляторов с диаметрами выходных отверстий 0.25 мм и 0.30 мм практически не отличаются друг от друга и идентичны дозам мелкодисперсных частиц, полученным на приборе А (55.73 мкг и 55.26 мкг соответственно). Это подтверждает положение о возможности использования двухкамерного прибора А для рутинного контроля респирабельной фракции вместо многоступенчатого импактора (прибора D).

По сравнению с препаратом *Сальбутамол-Тева, аэрозоль* суммарные фракции мелкодисперсных частиц сальбутамола, осажденные на ступенях 3-8, при использовании в препарате *Сальбутамол, аэрозоль* насадок-ингаляторов фирмы 2 оказываются на 20.08 % и 20.85 % меньше, что свидетельствует о неэквивалентности *in vitro* препарата *Сальбутамол, аэрозоль* препарату *Сальбутамол-Тева, аэрозоль*.

Суммарные фракции мелкодисперсных частиц сальбутамола, осажденные на ступенях 3-8, для препарата *Сальбутамол, аэрозоль*, укомплектованного насадками-ингаляторами с диаметром выходного отверстия 0.25 мм фирмы 1 и фирмы 2 составляют соответственно 76.70 мкг и 55.99 мкг, а различие между ними — 27.0 %.

Как видно из Табл. 9 и Рис. 9, профиль осаждения сальбутамола на ступенях прибора D у препарата *Сальбутамол, аэрозоль*, укомплек-

Рисунок 9



Профили осаждения сальбутамола на ступенях прибора D (по данным Табл. 3 и 9)

тованного насадками-ингаляторами фирмы 2, существенно отличается от соответствующего профиля осаждения у препарата *Сальбутамол-Тева, аэрозоль*. По сравнению с препаратом *Сальбутамол-Тева, аэрозоль* в L-образной трубке и на ступенях 0-3 осаждается существенно больше сальбутамола, а на ступенях 4-8 — гораздо меньше, что не соответствует установленным критериям приемлемости ± 15 % [6]. То есть, указанные насадки-ингаляторы фирмы 2 не обеспечивают эквивалентности *in vitro* разработанному препарату, которая обеспечивается при использовании насадки-ингалятора фирмы 1 с диаметром выходного отверстия 0.25 мм.

Таким образом, разные конструкции насадок-ингаляторов разных фирм при прочих равных фармацевтических факторах (состав препарата, размер суспендированных частиц сальбутамола сульфата, диаметр выходного отверстия 0.25 мм) могут оказаться существенным фактором, от которого зависят аэродинамические свойства препарата для ингаляции. Так, величины MMAD для препарата *Сальбутамол, аэрозоль*, укомплектованного насадками-ингаляторами фирмы 2 с диаметрами выходных отверстий 0.25 мм и 0.30 мм, составляют 3.0 мкм и 3.1 мкм соответственно, что больше, чем у препарата *Сальбутамол-Тева, аэрозоль* на 0.35 мкм и 0.45 мкм. При этом величины GSD у них практически не отличаются (≈1.6).

Одной из причин указанных различий в аэродинамических свойствах является разный угол и диаметр факела распыления, который во многом зависит от конструкции насадки-ингалятора, что наглядно представлено на Рис. 10.

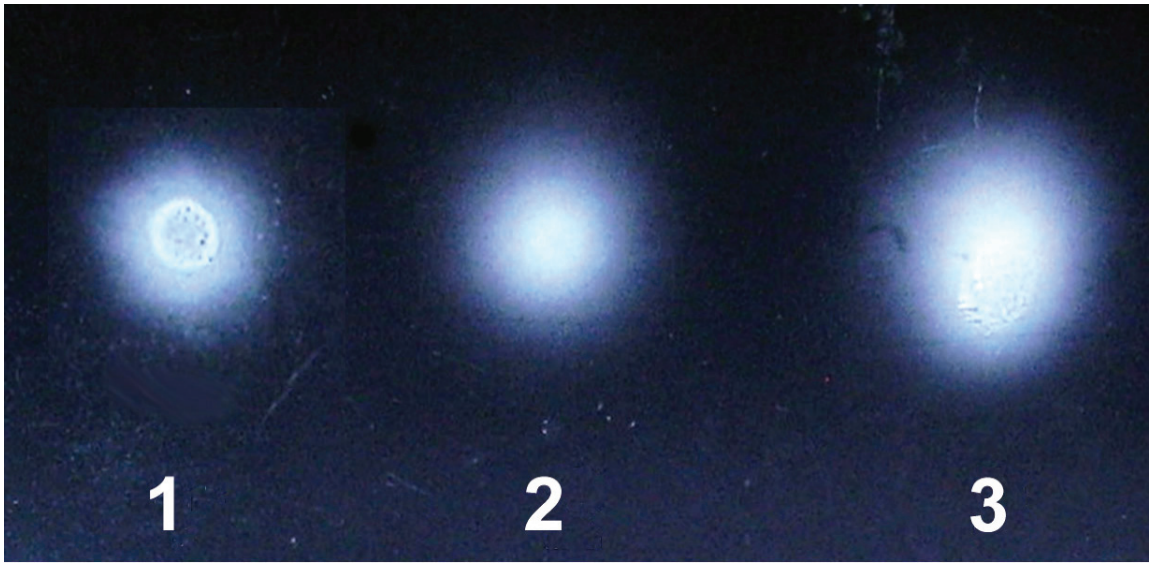
Как видно из Рис. 10, диаметры факелов распыления препарата *Сальбутамол-Тева, аэрозоль* и препарата *Сальбутамол, аэрозоль* с насадкой-ингалятором фирмы 1 (D = 0.25 мкм) близки друг к другу, а при использовании насадки-ингалятора фирмы 2 внешний диаметр факела распыления (диаметр разброса во внешней зоне) оказывается больше, что должно повлечь за собой большее оседание сальбутамола сульфата на внутренней поверхности L-образной трубки прибора D и насадки-ингалятора, а соответственно к уменьшению ДМДЧ и доставляемой дозы.

Выводы

1. Экспериментально установлено, что в препаратах сальбутамола сульфата в форме дозированных аэрозолей для ингаляции под давлением концентрация этанола и содержание в нем воды, а также диаметр выходного отверстия и конструкция насадки-ингалятора являются значимыми фармацевтическими факторами для дозы мелкодисперсных частиц и профиля осаждения сальбутамола в импинджерах и импакторах, предусмотренных в ГФУ для исследованиях их аэродинамических свойств.

2. Исследованы аэродинамические характеристики разработанного препарата *Сальбутамол, аэрозоль для ингаляций дозированный 100 мкг/доза* по сравнению с препаратом

Рисунок 10



Статические отпечатки факелов распыления аэрозольной струи препаратов:

1 — *Сальбутамол-Тева, аэрозоль*;
2 — *Сальбутамол, аэрозоль* с насадкой-ингалятором фирмы 1 (D = 0.25 мм);
3 — *Сальбутамол, аэрозоль* с насадкой-ингалятором фирмы 2 (D = 0.25 мм).

Сальбутамол-Тева, аэрозоль для ингаляций дозированный 100 мкг/доза с использованием приборов A, C, D и E в соответствии с общей статьей *2.9.18* ГФУ. Определены дозы мелкодисперсных частиц на всех четырех приборах, распределение частиц сальбутамола на ступенях приборов D и E и суммарные фракции сальбутамола, прошедшие ступени приборов D и E.

3. Для определения распределения частиц сальбутамола по размерам на этапе фармацевтической разработки, а также расчета MMAD и GSD следует использовать многоступенчатые приборы D и E, которые при исследовании аэрозолей сальбутамола оказались взаимозаменяемы. Показано, что использование прибора C для определения MMAD и GSD сальбутамола неприемлемо.

4. Респирабельную фракцию сальбутамола из расчета на одну дозу можно определять на всех четырех приборах. При этом для рутинного определения дозы мелкодисперсных частиц сальбутамола целесообразно использовать прибор A, а для количественного определения отдельных фракций сальбутамола — многоступенчатый прибор D или E.

5. Показано, что разработанный препарат *Сальбутамол, аэрозоль для ингаляций дозированный 100 мкг/доза* по распределению частиц по размерам на ступенях многоуровневых приборов D и E, другим аэродинамическим характеристикам (ДМДЧ, MMAD и GSD), а также доставляемой дозе эквивалентен *in vitro* препарату *Сальбутамол-Тева, аэрозоль для ингаляций дозированный 100 мкг/доза* при условии использования насадок-ингаляторов с диаметром выходного отверстия 0.25 мм, поставляемых фирмой 1.

ЛИТЕРАТУРА

1. 2.9.18. Лікарські засоби для інгаляції: Аеродинамічне визначення дрібнодисперсних частинок // Державна Фармакопея України : в 3 т. / Державне підприємство «Український науковий фарма-копейний центр якості лікарських засобів». — 2-е вид. — Харків: Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2015. — Т. 1 — С. 427-442.
2. Lippmann M. Regional Deposition of Particles in the Human Respiratory Tract // Comprehensive Physiology. — 2011. — P. 213-232.
3. Вопросы контроля качества лекарственных средств для ингаляции / Н.А. Ляпунов, Е.П. Безуглая, Е.К. Товмасян и др. // Фармаком. — 2006. — № 4. — С. 9-16.
4. Настанова СТ-Н МОЗУ 42-38:2013. — Лікарські засоби. Фармацевтична якість препаратів для інгаляції та назальних препаратів / О. Безугла, М. Ляпунов, О. Соловйов // Нормативні документи МОЗ України. Стандартизація фармацевтичної продукції. — Київ: МОЗ України, МОРІОН, 2016. — Т. 1. — С. 299-336.
5. Salbutamol Pressurised Inhalation // British Pharmacopoeia. — V. III. — 2013.
6. CPMP/EWP/4151/00 Rev. 1. — Guideline on the Requirements for Clinical Documentation for Orally Inhaled Products (OIP) Including the Requirements for Demonstration of Therapeutic Equivalence between two Inhaled Products for Use in the Treatment of Asthma and Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) in Adults and for Use in the Treatment of Asthma in Children and Adolescents. — London, 22 January 2009.
7. Регистр лекарственных средств России [Электронный ресурс]. Режим доступа: http://grls.rosminzdrav.ru/, свободный. — Загл. с экрана (дата обращения 30.10.2017).
8. European Pharmacopoeia. 9th Edition. — European Directorate for the Quality of Medicines (EDQM). — Council of Europe, 67075 Strasbourg Cedex, France 2016. — 4016 p.
9. Обоснование нового подхода к оценке качества дозированных аэрозолей для ингаляций на этапе их разработки / Н.А. Ляпунов, Е.П. Безуглая, В.А. Бовтенко, Ю.М. Столпер // Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Медицина. Фармация. — 2016. — № 5 (226), вып. 33. — С. 170-179.
10. 601. Aerosols, nasal sprays, metered-dose inhalers, and dry powder inhalers // USP 36 — NF 31. — The United States Pharmacopeia and National Formulary 2012 — Copyright © 2012 The United States Pharmacopeial Convention 12601 Twinbrook Parkway, Rockville, MD 20852 — Printed in the United States by United Book Press, Inc., Baltimore, MD. — P. 242-262.
11. Лікарські засоби для інгаляції // Державна Фармакопея України. — 2-е вид. — Харків, Державне підприємство «Український науковий центр якості лікарських засобів», 2015. — Т. 1. — С. 1083-1090.

УДК 615.451.35.015.3

Резюме

Бовтенко В. О., Безугла О. П.,
Столпер Ю. М, Ляпунов М. О.
Державна наукова установа «Науково-технологічний комплекс "Інститут монокристалів" НАН України», Харків

Вивчення властивостей препаратів сальбутамолу сульфату в формі дозованих інгаляторів під тиском

Показано, що в препаратах сальбутамолу сульфату в формі дозованих інгаляторів під тиском концентрація етанолу і вміст у ньому води, а також діаметр вихідного отвору та конструкція насадки-інгалятора є значущими фармацевтичними факторами для дози дрібнодисперсних частинок (ДДДЧ) і профілю осадження сальбутамолу, що визначають на приладах A, C, D і E відповідно до загальної статті *2.9.18* Державної Фармакопеї України (ДФУ). Для розробленого препарату *Сальбутамол, аерозоль для інгаляції дозований 100 мкг/доза* та препарату *Сальбутамол-Тева, аерозоль для інгаляції дозований 100 мкг/доза* проведено порівняльне визначення розмірів частинок сальбутамолу сульфату методом лазерної дифракції та аеродинамічних властивостей на приладах A, C, D і E методом рідинної хроматографії. Установлена еквівалентність *in vitro* цих препаратів за такими характеристиками, як доза, що доставляється, ДДДЧ (респірабельна фракція), розподіл частинок за розмірами, відносні кількості сальбутамолу, що пройшли кожний рівень приладів D і E, середній аеродинамічний діаметр маси (MMAD) і геометричне стандартне відхилення (GSD). Показано, що респірабельні фракції сальбутамолу, що визначають для конкретного препарату на приладах A, C і D, можна порівняти між собою; прилад A доцільно використовувати для рутинного контролю ДДДЧ, а прилади D і E — для контролю декількох фракцій частинок, визначення розподілу частинок за розмірами, а також MMAD і GSD.

Ключові слова: сальбутамол; аерозоль для інгаляції дозований; імпінджер; імпактор; доза дрібнодисперсних частинок; розподіл частинок за розмірами; середній аеродинамічний діаметр маси; геометричне стандартне відхилення; доза, що доставляється.

UDC 615.451.35.015.3

Summary

Bovtenko V. A., Bezuglaya E. P.,
Stolper Yu. M., Lyapunov N. A.
State Scientific Institution «Institute for Single Crystals» of the NAS of Ukraine, Kharkov

The study of the properties of salbutamol sulfate preparations in the form of pressurised metered-dose inhalers

It has been shown that for salbutamol sulfate preparations in the form of pressurised metered-dose inhalers, the concentration of ethanol and the content of water therein, as well as the orifice diameter and the design of the actuator are significant pharmaceutical factors for the fine particles dose and for the salbutamol deposition profile, which are determined using apparatuses A, C, D and E according to the State Pharmacopoeia of Ukraine (*2.9.18*). The comparative aerodynamic assessment of fine particles for the developed generic preparation *Salbutamol, pressurised metered-dose inhaler 100 μg/dose* and the reference preparation *Salbutamol-Teva, pressurised metered-dose inhaler 100 μg/dose* using apparatus A (glass impinger), apparatus C (multi-stage liquid impinger), apparatus D (Andersen cascade impactor) and apparatus E (new generation cascade impactor) was performed. The *in vitro* equivalence between the developed generic medicinal product and the reference product has been shown in regard to the main aerodynamic characteristics: the total fine particle doses (respirable fractions), the particle size distribution, the relative quantity of salbutamol passed each stage of the multistage apparatuses, the mass median aerodynamic diameter (MMAD) and the geometric standard deviation (GSD), as well as the delivered doses. It has been shown that the total fine particle doses of salbutamol, determined for each product using apparatus A, C and D, are comparable; apparatus A is useful for routine testing of the total respirable fraction, and multistage apparatuses D and E are suitable for the assessment of the individual fraction quantities of fine particles. Both products under study have had almost identical salbutamol particles distribution profiles at the stages of apparatuses D and E, as well as similar profiles of the salbutamol passing through stages of these apparatuses. When using device D, the largest quantity of salbutamol fine particles is deposited at stages 3, 4 and 5; this corresponds to a fraction with particle sizes from 4.7 μm to 1.1 μm. When using device E, the largest quantity of salbutamol fine particles is deposited at stages 4 and 5; this corresponds to a fraction with particle sizes from 3.99 μm to 1.36 μm. It has been established that in order to determine the particle size distribution, as well as MMAD and GSD, only apparatuses D and E should be used; the use of apparatus C is not acceptable for these purposes in testing Salbutamol pressurised inhalers. To determine the particle size distribution, as well as MMAD and GSD, only apparatuses D and E should be used; the use of apparatus C is not acceptable for these purposes in testing Salbutamol pressurised inhalers.

Keywords: salbutamol, pressurized metered dose inhaler, impinger, impactor, fine particle dose, particle size distribution, mass median aerodynamic diameter, geometric standard deviation, delivered dose.

Бовтенко Владимир Александрович. Окончил Харьковский национальный университет им. В. Н. Каразина (1994). Мл. науч. сотр. лаборатории технологии и анализа лекарственных средств Государственного научного учреждения «Научно-технологический комплекс "Институт монокристаллов" НАН Украины» (2013).

Безуглая Елена Петровна. Окончила Харьковский государственный фармацевтический институт (1990). К. фарм. н. (1996), ст. науч. сотр. (2000). Зав. лабораторией технологии и анализа лекарственных средств Государственного научного учреждения «Научно-технологический комплекс "Институт монокристаллов" НАН Украины» (2017).

Столпер Юрий Михайлович. Окончил Харьковский политехнический институт (1994). К. фарм. н. (2008), ст. науч. сотр. лаборатории технологии и анализа лекарственных средств Государственного научного учреждения «Научно-технологический комплекс "Институт монокристаллов" НАН Украины» (2013).

Ляпунов Николай Александрович. Окончил Харьковский фармацевтический институт (1972). Д. фарм. н. (1990), профессор (1993). Заслуженный научный консультант Государственного научного учреждения «Научно-технологический комплекс "Институт монокристаллов" НАН Украины» (2013).

УДК 615.074: 615.456.3

Стадниченко А. В., Краснопольский Ю. М., Ярных Т. Г.
Национальный фармацевтический университет, Харьков, Украина
Национальный технический университет «Харьковский политехнический институт», Харьков, Украина

Валидация методики количественного определения иринотекана гидрохлорида в липосомальной форме методом ВЭЖХ

В качестве объекта исследования использовали липосомальную форму иринотекана гидрохлорида, которая была получена по технологии «химического градиента» в его модификации «градиент pH». Разработана и валидирована методика количественного определения иринотекана гидрохдорида, предназначенная для использования на всех стадиях фармацевтической разработки, трансфера на производственные линии и контроля качества готового лекарственного средства.
Исследованы следующие валидационные характеристики: специфичность, правильность, линейность, прецизионность (сходимость) и внутрилабораторная прецизионность. Показано, что методика соответствует критериям Государственной Фармакопеи Украины и Руководства по валидации методик (под ред. Н. В. Юргеля и др.), предъявляемым к количественному определению действующих веществ в готовых лекарственных средствах с допусками содержания ± 5 %. Методика апробирована на наноструктурированной липосомальной форме иринотекана гидрохлорида.

Ключевые слова: иринотекана гидрохлорид, липосомы, количественное определение, валидация, фармацевтическая разработка, высокоэффективная жидкостная хроматография.

На стадии фармацевтической разработки любого лекарственного средства одной из важнейших задач является нахождение показателей контрольных точек технологического процесса в поле проектных параметров производственного оборудования и спецификаций — от начала исследований субстанции до контроля качества готового продукта. Так, количественное определение активного компонента является одной из характеристик данного поля параметров. Руководство EMA по фармацевтической разработке — ICH guideline Q8 (R2) — для целей регистрации лекарственного средства регламентирует наличие постадийных спецификаций контроля для разрабатываемого лекарственного средства, включая валидированные методики контроля [1]. Предусматривается наличие описания методики, статистические характеристики и первичная документация разработки. Корректная и валидированная методика количественного определения нужна на всех этапах фармацевтической разработки: при изучении химической совместимости со вспомогательными веществами, для оптимизации потерь при разрабатываемом технологическом процессе, при изучении взаимодействия препарата с системой «контейнер / укупорочный элемент» и для контроля стабильности в процессе хранения. Также методика используется на всем пути жизненного цикла препарата — при трансфере технологии на промышленную площадку, производственном и арбитражном контроле качества [2, 3].

Иринотекана гидрохлорид является цитостатическим препаратом группы камптотецинов, проявляя цитостатическое действие путем связывания с комплексом топоизомераза I-ДНК с последующим предотвращением сшивания нитей ДНК. Препараты иринотекана гидрохлорида в различных формах являются средством в первой и второй линиях химиотерапии, как при индивидуальном использовании, так и в комбинации с другими препаратами [4 — 7].

Липосомальные формы цитостатиков, в том числе и иринотекана, являются объектами исследования нанобиотехнологии [8]. Серьезным недостатком нелипосомальных цитостатических препаратов — растворов и концентратов — является высокая токсичность действия на организм в целом. Липосомальные формы цитостатиков обладают большим временем циркуляции в организме и проявляют селективность при воздействии на орган, нуждающийся в терапии, благодаря EPR-эффекту (enhanced permeability and retention effect). Также имеет место и регенерация с помощью компонентов фосфолипидной мембраны фосфолипидного бислоя, поврежденных биологических мембран организма [9, 10]. Это ведет к снижению токсичности действия цитостатика и может быть использовано как для улучшения качества жизни пациента, так и для увеличения лекарственной дозы и увеличения эффективности терапии. Это подтверждается тем, что недавно выпущенный на рынок препарат «Onivyde» (IPSEN, USA) показал преимущества в сравнении с нелипосомальными формами препарата [11].

Была разработана оригинальная, отличная от существующей на рынке, липосомальная форма иринотекана, представляющая собой

лиофилизат липосомальный для приготовления эмульсий для инъекций с содержанием иринотекана гидрохлорида в готовом препарате 2 мг/мл и степенью инкапсуляции не менее 80 % [12].

Цель исследования — продемонстрировать для методики количественного определения иринотекана гидрохлорида в готовом лекарственном средстве в виде лиофилизата для приготовления эмульсии для инъекций ее специфичность, а также ее соответствие количественным критериям для валидационных характеристик «линейность», «правильность», «прецизионность» (изучается в одном эксперименте) и «внутрилабораторная прецизионность». Подтвердить применимость методики для реального наноструктурированного и инкапсулированного объекта совместно с исследованием внутрилабораторной сходимости.

Материалы и методы исследования

В качестве объекта исследования использовали липосомальную форму иринотекана гидрохлорида, которая была получена по технологии «химического градиента» в его модификации «градиент pH» [13]. Использовали следующее оборудование: аналитические весы XP205DR с неопределенностью взвешивания не более 0.1 мг, Mettler Toledo, Швейцария; центрифугу SL 16R, ThermoScientific, США; pH-метр SevenMulti, Mettler Toledo, Швейцария. Количественное определение, а также валидационные исследования осуществляли на приборе Shimadzu LC-20, Япония, укомплектованном автоматическим инжектором SIL-30AC, термостатом колонок CTO-20AC, насосом LC-30AD и спектрофотометрическим детектором с диодной матрицей SPD-M20A.

Результаты исследования и их обсуждение

Количественное определение иринотекана проводили методом ВЭЖХ в нижеописанных условиях.

Подвижная фаза. Раствор А. 2.72 г калия фосфата однозамещенного помещали в стакан емкостью 1 л. Прибавляли 900 мл воды, перемешивали до полного растворения соли. Доводили pH раствора до 3.50 ± 0.05 ортофосфорной кислотой. Количественно переносили раствор в мерную колбу на 1 л и доводили водой до метки. Полученный раствор фильтровали через мембранный фильтр с размером пор не более 0.45 мкм и дегазировали.

Раствор Б. Смесь MeOH – ACN (2:3). Отмеряли мерным цилиндром 400 мл метанола для ВЭЖХ, помещали в коническую колбу на 1 л. Отмеряли 600 мл ацетонитрила для ВЭЖХ, прибавляли в колбу с метанолом, перемешивали. Полученный раствор фильтровали через мембранный фильтр с размером пор не более 0.45 мкм и дегазировали.

Растворитель. В качестве растворителя использовали 1% раствор Triton X-100 в растворе А, метаноле и ацетонитриле в соотношении 2:1:1.

Приготовление испытуемого раствора. Содержимое 10 флаконов с лиофилизатом переносили в ступку, измельчали и перемешивали. 500 мг усредненной пробы (точная навеска, неопределенность взвешивания не более 0.1 мг) помещали в мерную колбу на 50 мл, прибавляли растворитель и перемешивали. Доводили объем раствора до метки растворителем, перемешивали. Отбирали необходимый объем раствора и центрифугировали его 10 мин при 10000 об/мин.

Приготовление раствора сравнения. 20 мг (точная навеска, неопределенность взвешивания не более 0.1 мг) стандартного образца иринотекана гидрохлорида USP помещали в мерную колбу на 100 мл, прибавляли 60 – 70 мл растворителя, растворяли при перемешивании. Доводили объем растворителем до метки, перемешивали.

По 10 мкл испытуемого раствора и раствора сравнения попеременно хроматографировали на жидкостном хроматографе с УФ-спектрофотометрическим детектором в следующих условиях:

— колонка — Supelco Ascentis RP-Amid, 250 × 4 мм, 5 мкм;
— подвижная фаза — градиентное элюирование (Табл. 1);

Таблица 1
Программа градиентного элюирования

Время	Раствор А	Раствор Б
0 мин	80 %	20 %
40 мин	30 %	70 %
45 мин	30 %	70 %
50 мин	80 %	20 %
55 мин	80 %	20 %

— скорость подвижной фазы — 1 мл/мин;
— температура колонки — 30 °C;
— длина волны детектирования — 220 нм;
— время хроматографирования — 55 мин.

Содержание иринотекана гидрохлорида (X) в одном флаконе, в миллиграммах, рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{P \times m_{st} \times S_x \times V_x \times m_f}{100\,\% \times V_{st} \times S_{st} \times m_x},$$

где P — содержание иринотекана гидрохлорида в стандартном образце, в процентах;
m_{st} — масса навески стандартного образца, в миллиграммах;
m_x — масса навески препарата, в миллиграммах;
m_f — средняя масса содержимого флакона, в миллиграммах;
S_{st} — площадь пика иринотекана на хроматограмме стандартного образца;
S_x — площадь пика иринотекана на хроматограмме испытуемого раствора;
V_{st} — объем колбы для приготовления раствора сравнения, в миллилитрах;
V_x — объем колбы для приготовления испытуемого раствора, в миллилитрах.

Содержание иринотекана гидрохлорида в 1 флаконе должно быть от 19 мг до 21 мг.

Хроматограмма испытуемого раствора приведена на Рис. 1.

Валидационные исследования проводили в соответствии с принятым научно-методическим подходом [14, 15]. Были изучены такие характеристики, как специфичность, правильность, линейность, прецизионность, в том числе внутрилабораторная сходимость. Валидационная характеристика «робастность» была изучена на этапе разработки методики.

Методика использовалась с самого начала фармацевтической разработки, и изначально не было определено конечное содержание основного вещества в препарате. Ввиду этого валидационные характеристики изучалась в диапазоне концентраций от 0.2 мг/мл до 3 мг/мл, или 10 – 140 % от содержания иринотекана гидрохлорида в готовой лекарственной форме при рекомендованных 80 – 120 %.

Специфичность метода подтверждали хроматографированием раствора плацебо препарата. На хроматограмме отсутствовали пики, по времени удерживания совпадающие с пиком удерживания иринотекана гидрохлорида.

Валидационные характеристики «правильность», «линейность», «прецизионность» исследовали на модельных растворах. Результаты исследований характеристики «правильность» приведены в Табл. 2.

По результатам эксперимента были рассчитаны параметры линейной зависимости найденного количества иринотекана гидрохлорида от введенного. Результаты приведены в Табл. 3 и на Рис. 2.

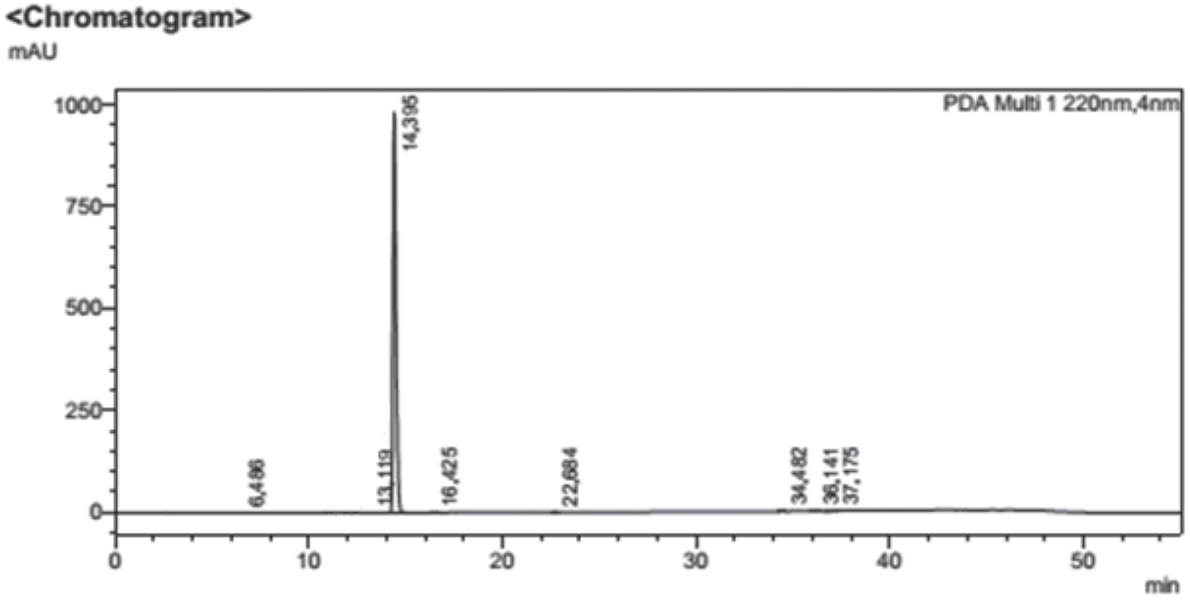
Для операций взвешивания использовали весы 1-го класса с неопределенностью взвешивания 0.1 мг согласно документации производителя. Весы с данными характеристиками широко используются в фармацевтических ла-

Таблица 2

Результаты эксперимента по определению содержания иринотекана гидрохлорида в образцах и их статистическая обработка

№ модельного раствора	Концентрация иринотекана, мг/мл (c_{st} = 2.2 мг/мл)	Средние площади пиков (S_{st} = 11016784)	Найдено, в % к введенному, $Z_i = 100 \times (Y_i/X_i)$, %
1	0.2	1003568	100.20
2	0.4	2034766	101.58
3	0.8	4021607	100.39
4	1.2	6071344	101.03
5	1.6	8069734	100.72
6	2.0	10042024	100.27
7	2.4	11905740	99.06
8	2.8	13905655	99.17
9	3.0	15163036	100.93
		Среднее, Z_{cp}, %	100.37
		Относительное стандартное отклонение, s_z, %	0.83
		Относительный доверительный интервал, $\Delta_z = s_z(\%) \times t(95\,\%, n-1) \le \Delta_{As}$	1.55
		Критическое значение для сходимости результатов Δ, %	1.60
		Оценка сходимости $\Delta_z \le 1.6$ %	1.55 < 1.60
		Систематическая погрешность $\delta\,\% = \lvert\overline{Z} - 100\rvert$	0.37
		Оценка правильности Критерий незначимости систематической погрешности статистическая незначимость $\delta\% \le \frac{\Delta_Z}{\sqrt{n}} = \frac{1.55}{3} = 0.52$ выполняется	0.37 < 0.52

Рисунок 1



Хроматограмма испытуемого раствора препарата «Иринотекан липосомальный, лиофилизат для приготовления эмульсий»

бораториях. В связи с этим в методику внесено соответствующее указание (навеска стандартного образца и навеска испытуемого препарата берется с неопределенностью не более 0.1 мг). Прогноз неопределенности пробоподготовки проводили с использованием значения 0.1 мг для операций взвешивания.

Суммарная погрешность пробоподготовки составила:

$$\Delta_{SP,r} = \sqrt{(0.1/20\times100)^2 + 0.12^2 + \\ +(0.1/500\times100)^2 + 0.17^2} = \\ = \sqrt{0.5^2 + 0.12^2 + 0.02^2 + 0.17^2} = 0.54.$$

Рисунок 2

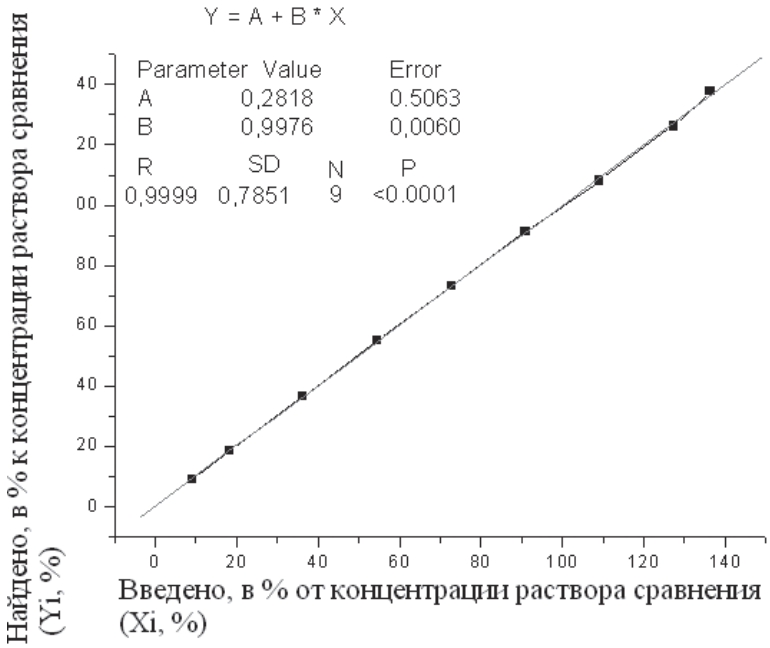


График и характеристики линейной зависимости найденного количества иринотекана гидрохлорида от введенного

Для готовой лекарственной формы с пределами количественного содержания 95 – 105 % максимальная допустимая неопределенность анализа Δ_{As} составляет $0.32 \times (B_H - B_L)/100 = 1.60$ %. Соответственно, максимально допустимая неопределенность пробоподготовки $\Delta_{SP,r}$ составляет:

$$\Delta_{SP,r} = 0.32 \times \Delta_{As} \times 0.32 \times 1.60\ \% = 0.51\ \%.$$

Таким образом, неопределенность пробоподготовки несколько превышает предельно допустимое значение. В связи с этим были рассчитаны более жесткие требования к RSD_{max} при проверке пригодности хроматографической системы, при которых выполняются требования к $\Delta_{As} \le 1.6$ %, приведенные в Табл. 4.

Данные требования к RSD_{max} следует использовать при выполнении анализа.

Также было проведено исследование внутрилабораторной сходимости на образцах готового лекарственного средства иринотекана гидрохлорида в виде лиофилизата для приготов-

Таблица 3

Метрологические характеристики линейной зависимости найденных концентраций иринотекана гидрохлорида от его введенного количества

Величина	Значение	Критерий (для допусков 95–105 %), n = 9	Вывод
b	0.9976	—	—
S_b	0.0060	—	—
a	0.2818	$\le 1.8946 \times S_a = 0.96$	соответствует
S_a	0.5063	—	—
S_0	0.7851	$\frac{s_0}{b} \le \frac{\Delta_{As}}{t(95\ \%, n-2)}$ $-0.7869 < 0.8445$	соответствует
r	0.9999	≥ 0.9999	соответствует

Таблица 4

Требования к RSD_{max} при проведении теста «Пригодность хроматографической системы»

n	$t(95\ \%, n-1)$	Рассчитанные требования к RSD_{max}, %	Исходные требования ГФУ к RSD_{max}, %
2	6.3138	0.24	0.25
3	2.9200	0.63	0.67
4	2.3534	0.90	0.96
5	2.1318	1.12	1.19

Таблица 5

Результаты исследования образцов иринотекана гидрохлорида в виде лиофилизата для приготовления эмульсии для инъекций

Номер пробы (n = 9) по дням исследования Показатели и критерии приемлемости		Содержание вещества в пробе (нормализованные значения)
День 1	№ 1 – 1	97.51
	№ 1 – 2	100.23
	№ 1 – 3	99.49
День 2	№ 2 – 1	98.51
	№ 2 – 2	99.13
	№ 2 – 3	100.14
День 3	№ 3 – 1	98.96
	№ 3 – 2	99.42
	№ 3 – 3	99.67
Среднее значение (n = 9), $\overline{Z}$, %		99.23
Относительное стандартное отклонение, RSD_z, %		0.85
Относительный доверительный интервал, $\Delta_z = RSD_z(\%) \times t(95\ \%, n-1) \le \Delta_{As}$		1.58
Критическое значение для сходимости результатов Δ, %		1.60
Оценка сходимости $\Delta_z \le 1.6$ %		1.58 < 1.60
Вывод о соответствии критерию «внутрилабораторная сходимость»		Соответствует

ления эмульсии для инъекций. Приготовление испытуемого раствора было осуществлено по описанной ранее методике. Испытания проводили в течение 3 дней. Результаты исследования приведены в Табл. 5.

Проведенные исследования подтвердили возможность использования разработанной методики при проведении фармацевтической разработки и анализа образцов готовых лекарственных средств иринотекана гидрохлорида в виде лиофилизата для приготовления эмульсии для инъекций.

Заключение

1. Разработана методика количественного определения иринотекана гидрохлорида в лиофилизате для приготовления эмульсий для парентерального введения.

2. Выполнено исследование валидационных характеристик «специфичность», «правильность», «линейность», «прецизионность», в том числе «внутрилабораторная сходимость». Подтверждено, что методика соответствует критериям, предъявляемым к методикам количественного определения действующих веществ в лекарственных средствах.

3. Методика успешно апробирована на образцах готового лекарственного средства.

ЛИТЕРАТУРА

1. СТ-Н МОЗУ 42-3.0:2011. — Лікарські засоби. Фармацевтична розробка (ICH Q8) / М. Ляпунов, О. Безугла, Ю. Підпружников та ін. // Стандартизація фармацевтичної продукції. — Київ: МОЗ України, МОРІОН, 2012. — С. 21—56.
2. Настанова 42-3.3:2004. — Лікарські засоби. Випробування стабільності / В. Георгієвський, М. Ляпунов, О. Безугла та ін. // Стандартизація фармацевтичної продукції. — Київ: МОЗ України, МОРІОН, 2012. — С. 121—188.
3. Настанова 42-3.2:2004. — Лікарські засоби. Специфікації: контрольні випробування та критерії прийнятності / В. Георгієвський, М. Ляпунов, О. Безугла та ін. // Стандартизація фармацевтичної продукції. — Київ: МОЗ України, МОРІОН, 2012. — С. 79—120.
4. Efficacy of treatment with irinotecan and oxaliplatin combination in FU-resistant metastatic colorectal cancer patients / E. Bajetta [et al.] // Oncology. — 2004. — № 66. — P. 132—137.
5. Guo Y. Capecitabine plus irinotecan versus 5-FU/leucovorin plus irinotecan in the treatment of colorectal cancer: a meta-analysis / Guo Y., Shi M., Shen X. // Clinical Colorectal Cancer. — 2014. — Vol. 2. — P. 110—118.
6. Onivyde (irinotecan liposome injection): EPAR — Product Information. European Medicines Agency. 25 October 2016.
7. Efficacy of treatment with irinotecan and oxaliplatin combination in FU-resistant metastatic colorectal cancer patients / E. Bajetta [et al.] // Oncology. — 2004. — № 66. — P. 132—137.
8. Швец В.И. Липосомы в фармации. Продукты нанобиотехнологии / В.И. Швец, Ю.М. Краснопольский // Провизор. — 2008. — № 3. — С. 18—24.
9. Барышников А.Ю. Наноструктурированные липосомальные системы как средство доставки противоопухолевых препаратов / А.Ю. Барышников // Актуальные вопросы онкологии. — Вестник РАМН, 2012. — № 3. — С. 23—31.
10. Marier J.F. Pharmacokinetics and Efficacies of Liposomal and Conventional Formulations of Tobramycin after Intratracheal Administration in Rats with Pulmonary Burkholderia cepacia Infection / Marier J.F., Lavigne J., Ducharme M.P. // Antimicrob Agents Chemother. — 2002. — № 46. — P. 3776—3781.
11. Zhang H. Onivyde for the therapy of multiple solid tumors. // Onco Targets Ther. — 2016. — Vol. 9. — P. 3001—3007.
12. Стадниченко А.В. Разработка и валидация методики определения степени инкапсуляции иринотекана гидрохлорида в липосомы / А.В. Стадниченко, Ю.М. Краснопольский, В.И. Швец // Биофармацевтический журнал. — 2015. — Т. 7, № 1. — С. 53—55.
13. Стадниченко А.В. Исследование стабильности иринотекана при использовании различных методов активной загрузки липосом / А.В. Стадниченко, Ю.М. Краснопольский, В.И. Швец, Т.Г. Ярных // ScienceRise: Pharmaceutical Science. — 2016. — Т. 2, № 2. — С. 30—35.
14. 5.3.N.2. Валідація аналітичних методик і випробувань // Державна Фармакопея України: в 3 т. / Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». — 2-е вид. — Харків: Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2015. — Т. 1. — С. 910-929.
15. Руководство по валидации методик анализа лекарственных средств / Под ред. Н.В. Юргеля, А.Л. Младенцева, А.В. Бурдейна и др. — М.: Фармацевтическая промышленность, 2007. — 58 с.

УДК 615.074: 615.456.3

Резюме

Стадніченко О. В., Краснопольський Ю. М., Ярних Т. Г.
Національний фармацевтичний університет, Харків, Україна
Національний технічний університет «Харківський політехнічний інститут», Харків, Україна

Валідація методики кількісного визначення іринотекану гідрохлориду у ліпосомальній формі методом ВЕРХ

Як об'єкт дослідження використовували ліпосомальну форму іринотекану гідрохлориду, яка була отримана за технологією «хімічного градієнта» у його модифікації «градієнт pH». Розроблено і валідовано методику кількісного визначення іринотекану гідроходириду, призначену для використання на всіх стадіях фармацевтичної розробки, трансферу на виробничі лінії і контролю якості готового лікарського засобу.

Досліджені такі валідаційні характеристики: специфічність, правильність, лінійність, прецизійність (збіжність), внутрішньолабораторна прецизійність. Показано, що методика відповідає критеріям Державної Фармакопеї України та Керівництва з валідації методик (під ред. М. В. Юргеля та ін.), що висуваються до кількісного визначення діючих речовин у готових лікарських засобах з допусками вмісту ± 5 %. Методику апробовано на наноструктурованій ліпосомальній формі іринотекану гідрохлориду.

Ключові слова: іринотекану гідрохлорид, ліпосоми, кількісне визначення, валідація, фармацевтична розробка, високоефективна рідинна хроматографія.

UDC 615.074: 615.456.3

Summary

Stadnichenko O. V., Krasnopolsky Y. M., Yarnykh T. G.
National University of Pharmacy, Kharkiv, Ukraine
National Technical University «Kharkiv Polytechnic Institute», Kharkiv, Ukraine

Validation of the procedure for the assay of irinotecan hydrochloride in the liposomal form by HPLC method

An original liposome form of irinotecan, which is a liposomal lyophilisate for the preparation of emulsions for injections, was developed. The procedure for the assay of irinotecan hydro-

chloride, intended for the use at all stages of pharmaceutical development, transfer to production lines and quality control of the finished medicinal product, was developed. The linearity of the procedure was studied in the range from 10 % to 140 % of the nominal content of irinotecan.

The following validation characteristics were investigated: specificity, accuracy, linearity, precision (repeatability) and intermediate precision. The procedure meets the requirements of the State Pharmacopoeia of Ukraine and Guidance on validation of analytical procedures (ed. Yurgel et. al, 2007) for assays of active pharmaceutical ingredients in finished drug products with content limits of ± 5 %. The uncertainty prognosis for the developed procedure, when used in another laboratory, does not exceed the critical value for the total permissible uncertainty of the analysis of 1.6 %.

Keywords: irinotecan hydrochloride, liposomes, validation, assay, pharmaceutical development, high performance liquid chromatography.

Стадниченко Александр Викторович. Окончил химический факультет Харьковского национального университета им. В. Н. Каразина (2003). К. фарм. н. (2010). Докторант кафедры технологии лекарств Национального фармацевтического университета.

Краснопольский Юрий Михайлович. Д. фарм. н. (1988), профессор (1991) кафедры биотехнологии Национального технического университета «ХПИ».

Ярных Татьяна Григорьевна. Д. фарм. н. (1992), профессор (1994), зав. кафедрой технологии лекарств Национального фармацевтического университета.

Лікарська рослинна сировина

УДК 615.322 + 582.929.2

Грицик А. Р., Свірська С. П.
ДВНЗ «Івано-Франківський національний медичний університет»

Дослідження умов зростання *Anchusa officinalis* L. та *Anchusa procera* Bess. у деяких регіонах України

За результатами дослідження місць зростання ценопопуляцій *Anchusa officinalis* L. та *Anchusa procera* Bess. на території Івано-Франківської, Тернопільської та Одеської областей встановлено екотопічні та фітоценотичні умови зростання вказаних видів. *A. officinalis* та *A. procera* є синантропними компонентами флори, котрі зростають як на біотопах, створених людиною, так і у напівприродних угрупованнях. У межах досліджуваних фітоценозів *A. officinalis* та *A. procera* є співдомінантами, іноді — асектаторами. Найчастіше в угрупованнях із *A. officinalis* та *A. procera* зростають *Elytrigia repens* (L.) Nevski та *Achillea submillefolium* Klok. et Krytzka. На основі аналізу кліматичних умов зростання *A. officinalis* та *A. procera* встановлено, що зазначені види зростають переважно в умовах помірного зволоження.

Ключові слова: Anchusa officinalis, *Anchusa procera*, рослинне угруповання, умови зростання.

Визначення особливостей зростання лікарських рослин є необхідним етапом у забезпеченні раціонального їх використання, збереження та відновлення в умовах постійного впливу антропогенних чинників. Оскільки зовнішнє середовище є основою існування рослинності, то вивчення їх взаємозв'язку є важливою складовою частиною процесу дослідження такої взаємодії. Вплив живлення, світла, температури та вологості на обмін речовин у рослинах є визначальним фактором формування в них якісного та кількісного вмісту біологічно активних речовин [1].

Перспективним джерелом біологічно активних речовин є види роду воловик — *Anchusa* L., які здавна використовують у народній медицині різних країн. Основними фармакологічними ефектами цих видів є противиразковий, протизапальний, антибактеріальний, ранозагоювальний, антиоксидантний, ферменто- та гормонорегулюючий тощо [2, 3]. Види *Anchusa* зростають переважно в Європі, Західній Азії і Тропічній Африці. За оцінкою Selvi F. та Bigazzi M., у Середземноморському басейні та на Близькому Сході зростає від 27 до 30 видів *Anchusa*. Основним центром їх різноманіття є південна частина Балканського півострова [3, 4]. Види *Anchusa* є ендемічними або реліктовими в тих чи інших країнах. Так, *A. stylosa* M. Bieb. — релікт флори Болгарії, *A. leucantha* Selvi & Bigazzi — ендем Греції, *A. leptophylla* Roemer & Schultes та *A. leptophylla* subsp. *incana* (Ledeb.) D. F. Chamb. — ендеми Туреччини, *A. capellii* Moris, *A. Crispa* Viv., *A. crispa* subsp. *maritima* (Vals.) Selvi & Bigazzi, *A. formosa* Selvi, Bigazzi & Bacch., *A. littorea* Moris, *A. sardoa* (Illario) Selvi & Bigazzi та *A. montelinasana* Angius, Pontec. & Selvi — ендеми Італії, а саме о. Сардинія. *A. littorea* перебуває на межі зникнення і тому підлягає особливій охороні для збереження популяції [3, 5].

На території України зростає 11 видів роду воловик [3, 6-8]. Вони переважно ростуть

у лісостепових районах, рідше — у степу, а *A. leptophylla* Roem. & Schult., *A. thessala* Boiss. et Sprun., *A. pusilla* Gusul. — лише на Кримському півострові [3]. *A. pseudoochroleuca* Shost., *A. azurea* Mill., *A. barrelieri* (All.) Vitm. та *A. popovii* (Gusul.) Dobrocz. внесені до офіційних переліків регіонально рідкісних видів адміністративних територій України [9].

Вчені Інституту ботаніки ім. М. Г. Холодного НАН України досліджували рослинність і флору біосферних (БЗ) та природних заповідників (ПЗ) України [9]. На території заповідного масиву «Чорна гора» (БЗ «Карпатський») можна зустріти рідкісний для українських Карпат вид — *A. barrelieri*. *A. gmelini* Ledeb. — типовий вид піщаного степу, є ендемічним причорноморським літоральним видом БЗ «Чорноморський». *A. procera* Bess. входить до складу ценозів луків ПЗ «Єланецький степ». Вузькоареальний вид *A. popovii* властивий флористичному комплексу сухих пісків Станично-Луганського відділення ПЗ «Луганський» [10].

Мета дослідження — встановлення та аналіз особливостей умов зростання *A. officinalis* та *A. procera*. Для досягнення мети нами було поставлено такі завдання: виявлення місць зростання — локалітетів ценопопуляцій *Anchusa*; характеристика екотопічних та фітоценотичних умов зростання зазначених видів.

Матеріали і методи досліджень

Для виконання поставлених завдань нами було проведено геоботанічні дослідження на території Івано-Франківської, Тернопільської та Одеської областей упродовж 2012-2017 рр. Дослідження проводили маршрутним методом шляхом закладання пробних ділянок площею 5×2 м^2. Рясність видів встановлювали окомірно, згідно зі шкалою Браун-Бланке, середнє проективне покриття виду в межах пробної ділянки — за допомогою сітки Л. Г. Раменського розміром 1×1 м^2. Назви видів наведено за Mosyakin S. L., Fedoronchuk M. M. [6]. Геоботанічне районування — згідно з [11] з уточненнями Дідух Я. П., Шеляг-Сосонко Ю. Р. [12]. Встановлення едафічних умов зростання проводили методом польового дослідження та за допомогою гео-інформаційного сервісу GIS File [13]. Дані кліматичних умов отримані за допомогою інформаційних серверів погоди, зокрема Українського гідрометеорологічного центру [14]. Об'єктами вивчення стали рослинні угруповання, їх склад, структура та умови зростання.

Результати досліджень і їх обговорення

Аналіз літературних даних свідчить, що *A. officinalis* та *A. procera* є найбільш розповсюдженими видами роду *Anchusa* в Україні [3, 6-8, 15].

Вивчення умов зростання *A. officinalis* проводили на прикладі трьох локалітетів на території Івано-Франківської області (у Калуському та Тисменицькому районах) та одного в Тернопільській області (у Кременецькому районі).

У Калуському районі *A. officinalis* зростає на забур'янених місцях та похилих південно-східних схилах пагорбів поблизу с. Боднарів, с. Вістова, а також уздовж доріг на околицях м. Калуш. Зазначений локалітет знаходиться на висоті 230 – 303 м над рівнем моря в межах Калуської западини Передкарпатського передгір'я та Прилуквинської височини. За геоботанічним районуванням ця територія належить до Передгорганського підрайону Болехівсько-Берегометського району Карпатського (Рахівсько-Турківсько-Берегометського) округу Східнокарпатської гірської підпровінції Центральноєвропейської провінції Європейської широколистянолісової області. У межах досліджуваних рослинних угруповань *A. officinalis* є співдомінантом. Рясність виду відповідає 3 за шкалою Браун-Бланке, середнє проективне покриття виду в межах заростей — 30 %. Ґрунти — дернові опідзолені та оглеєні. Разом із *A. officinalis* зростають: *Elytrigia repens* (L.) Nevski, *Lamium album* L., *Achillea submillefolium* Klok. et Krytzka, *Plantago media* L., *Vicia cracca* L., *Trifolium pratense* L., *Lactuca serriola* Torner, *Leucanthemum vulgare* Lam., *Holcus lanatus* L.

У Тисменицькому районі виявлено два локалітети виду: перший — на перелогах поблизу залізничної станції с. Хриплин та на забур'янених місцях в околицях м. Івано-Франківськ, другий — на крутих південних схилах пагорбів біля с. Підлісся та на забур'янених місцях біля с. Загвіздя. Зазначені локалітети знаходяться на висоті 257 – 280 м над рівнем моря в межах Бистрицької западини Передкарпатського передгір'я. За геоботанічним районуванням ця територія належить до Івано-Франківсько-Коломийського району Карпатського (Рахівсько-Турківсько-Берегометського) округу Східнокарпатської гірської підпровінції Центральноєвропейської провінції Європейської широколистянолісової області. У межах досліджуваних угруповань *A. officinalis* є співдомінантом. Рясність виду відповідає 2 за шкалою Браун-Бланке, середнє проективне покриття виду в межах заростей — 20 %. Ґрунти — дернові середньо- і сильнопідзолисті поверхнево-оглеєні. Разом із *A. officinalis* зростають: *Cirsium arvense* (L.) Scop., *Elytrigia repens*, *Achillea submillefolium*, *Leucanthemum vulgare*, *Artemisia absinthium* L., *Galium aparine* L.,

Melilotus officinalis (L.) Pall., *Vicia cracca*, *Erigeron canadensis* L., *Plantago media* L.

У Кременецькому районі *A. officinalis* зростає на перелогах і крутих південних схилах пагорбів біля с. Млинівці, с. Устечко та с. Очеретне. Зазначений локалітет знаходиться на висоті 296 – 308 м над рівнем моря в межах Волино-Подільської височини. За геоботанічним районуванням ця територія належить до Вишнівецького району Теофіпольсько-Ярмолинського

Таблиця 1

Еколого-ценотичні умови зростання *A. officinalis* та *A. procera*

Досліджуваний вид	Локалітет	Супутні види в угрупованнях видів *Anchusa*	Тип ґрунту
A. officinalis	Івано-Франківська область, Калуський район	*Elytrigia repens*, *Lamium album*, *Achillea submillefolium*, *Plantago media*, *Vicia cracca*, *Trifolium pratense*, *Lactuca serriola*, *Leucanthemum vulgare*, *Holcus lanatus*	Дернові опідзолені та оглеєні
	Івано-Франківська область, Тисменицький район	*Cirsium arvense*, *Elytrigia repens*, *Achillea submillefolium*, *Leucanthemum vulgare*, *Artemisia absinthium*, *Galium aparine*, *Melilotus officinalis*, *Vicia cracca*, *Erigeron canadensis*, *Plantago media*	Дернові середньо- і сильнопідзолисті поверхнево-оглеєні
	Тернопільська область, Кременецький район	*Elytrigia repens*, *Achillea submillefolium*, *Urtica dioica*, *Plantago media*, *Artemisia absinthium*, *Betonica officinalis*, *Salvia nutans*, *Alchemilla acutiloba*, *Hedera helix*, *Rubus caesius*, *Cichorium intybus*	Темно-сірі опідзолені
A. procera	Одеська область, Овідіопольс-кий район	*Cirsium arvense*, *Elytrigia repens*, *Galium verum*, *Achillea submillefolium*	Чорноземи південні малогумусні

Таблиця 2

Кліматичні умови зростання *A. officinalis* та *A. procera* протягом 2007-2016 рр.

Локалітет	Середньорічна температура, °С	Середня температура у вегетаційний період*, °С						Середня сума опадів за рік / у вегетаційний період*, мм	Кількість днів опадів у вегетаційний період*
		квітень	травень	червень	липень	серпень	вересень		
Івано-Франківська область, Калуський район	8.6	9.2	14.0	17.3	19.2	18.6	14.0	761/524	76
Івано-Франківська область, Тисменицький район	8.8	9.8	14.7	18.2	20.0	19.3	14.4	672/448	95
Тернопільська область, Кременецький район	8.6	9.5	15.0	18.0	20.3	19.5	14.6	326/163	42
Одеська область, Овідіопольський район	11.8	10.6	17.1	21.6	24.0	23.9	18.3	490/238	62

Примітка. * — період з початку квітня до кінця вересня.

Таблиця 3

Екотопічні характеристики досліджуваних видів

Критерій	*A. officinalis*	*A. procera*
Біоморф	Гемікриптофіт	Гемікриптофіт
Гідроморф	Мезоксерофіт	Мезоксерофіт
Термоморф	Мезотермофіт	Мегатермофіт
Геліоморф	Геліофіт	Геліофіт
Трофоморф	Мезотроф	Мезотроф
Екоценоморф	Синантропофант	Синантропофант

(Північноподільського) округу Подільсько-Середньопридніпровської підпровінції Східноєвропейської провінції Європейсько-Сибірської лісостепової області. У межах досліджуваних ценозів *A. officinalis* є асектатором. Рясність виду відповідає + за шкалою Браун-Бланке. Ґрунти — темно-сірі опідзолені. У досліджуваних угрупованнях також зростають: *Elytrigia repens*, *Achillea submillefolium*, *Urtica dioica* L., *Plantago media*, *Artemisia absinthium*, *Betonica officinalis* L. s.l., *Salvia nutans* L., *Alchemilla acutiloba* Opiz, *Hedera helix* L., *Rubus caesius* L., *Cichorium intybus* L.

Вивчення умов зростання *A. procera* Bess. проводили на прикладі одного локалітету на території Одеської області (в Овідіопольському районі). *A. procera* зростає на перелогах, уздовж доріг та залізниць поблизу смт. Таїрове, с. Бурлача Балка та на забур'янених місцях в околицях м. Чорноморськ. Зазначений локалітет знаходиться на висоті 43 – 47 м над рівнем моря в межах Причорноморської низовини. За геоботанічним районуванням ця територія належить до Біляївсько-Комінтернівського району Овідіопольсько-Баштансько-Апостолівського (Дністровсько-Дніпровського) округу, смуги типчаково-ковилових степів Приазовсько-Чорноморської степової підпровінції Причорноморської (Понтичної) степової провінції Європейсько-Азіатської степової області. У межах досліджуваних угруповань *A. procera* є співдомінантом. Рясність виду відповідає 3 за шкалою Браун-Бланке, середнє проективне покриття виду в межах заростi — 30 %. Ґрунти — чорноземи південні малогумусні. Разом із *A. procera* зростають: *Cirsium arvense*, *Elytrigia repens*, *Galium verum* L., *Achillea submillefolium.*

Фітоценотичні умови зростання *A. officinalis* та *A. procera* наведені у Табл. 1.

Дані Табл. 1 свідчать, що найчастіше в угрупованнях із *A. officinalis* та *A. procera* зростають *Elytrigia repens* та *Achillea submillefolium*.

У межах досліджуваних локалітетів було встановлено їх кліматичні характеристики. Аналізу підлягали: середньорічна температура, максимальна і мінімальна температури в різні періоди вегетації, середня сума опадів за рік загалом та впродовж вегетаційного періоду зокрема, кількість днів без опадів упродовж вегетаційного періоду (Табл. 2).

Дані Табл. 2 свідчать, що *A. officinalis* та *A. procera* ростуть переважно в умовах помірного зволоження.

На підставі аналізу умов зростання *A. officinalis* та *A. procera* у межах розглянутих локалітетів було зроблено порівняльну характеристику досліджуваних видів за відношенням до кліматичних умов, водного, теплового режимів та ґрунтів. Отримані дані наведено в Табл. 3.

Дані Табл. 3 вказують, що досліджувані види відрізняються лише за відношенням до теплового режиму. *A. officinalis* та *A. procera* є синантропними компонентами флори, котрі зростають як на біотопах, створених людиною, так і проникають у напівприродні угруповання.

Висновки

У результаті роботи було встановлено локалітети зростання *A. officinalis* та *A. procera* на території Івано-Франківської, Тернопільської та Одеської областей, а також виявлено особливості екотопічних та фітоценотичних умов їх зростання у встановлених локалітетах.

Проведені геоботанічні дослідження свідчать, що *A. officinalis* та *A. procera* зростають на перелогах, уздовж доріг, на схилах пагорбів та забур'янених місцях у синантропних ценозах. Зазначені види у межах фітоценозів досліджуваних локалітетів виконують роль співдомінанта, іноді — асектатора. Найчастіше разом із *A. officinalis* та *A. procera* зростають *Elytrigia repens* та *Achillea submillefolium*. Перспективою подальших досліджень є визначення стану ресурсів *A. officinalis* та *A. procera* шляхом встановлення обсягів можливих щорічних заготівель на певній території.

ЛІТЕРАТУРА

1. Фармакогнозія: базовий підруч. для студ. вищ. фармац. навч. закл. (фармац. ф-тів) IV рівня акредитації / В.С. Кисличенко, І.О. Журавель, С.М. Марчишин та ін.; за ред. В.С. Кисличенко. – Харків: НФаУ: Золоті сторінки, 2015. – 736 с.

2. Лікарські рослини: Енциклопедичний довідник / А.П. Лебеда, Н.І. Джуренко, О.П. Ісайкіна та ін.; За ред. А.М. Гродзінського. – К.: УРЕ ім. М.П. Бажана: Укр. вироб.-комерц. центр «Олімп», 1992. – 543 с.

3. Грицик А.Р. Природа лікує... Рослини роду Воловик: ботанічна характеристика, склад та фармакологічна дія: монографія / А.Р. Грицик, С.П. Свірська. – Івано-Франківськ: Видавець Кушнір Г.М., 2017. – 109 с.

4. Selvi F. Revision of genus *Anchusa* (*Boraginaceae-Boragineae*) in Greece / F. Selvi, M. Bigazzi // Botanical Journal of the Linnean Society. – 2003. – Vol. 142. – P. 431-454.

5. Bacchetta G. Systematics, phylogenetic relationships and conservation of the taxa of Anchusa (Boraginaceae) endemic to Sardinia (Italy) / G. Bacchetta, A. Coppi, C. Pontecorvo, F. Selvi // Systematics and Biodiversity, 2008. – Vol. 6 (2). – P. 161-174.

6. Визначник рослин України / за ред. Д. Зерова. – К.: Урожай, 1965. – 878 с.

7. Прокудин Ю.Н. Определитель высших растений Украины / Ю.Н. Прокудин, М.И. Котов, Д.Н. Доброчаева и др. – К.: Наукова думка, 1987. – 548 с.

8. Mosyakin, S.L. Vascular plants of Ukraine: a nomenclatural checklist / S.L. Mosyakin, M.M. Fedoronchuk // National Academy of Sciences of Ukraine, M.G. Kholodny Institute of Botany. – K., 1999. – 345 с.

9. Офіційні переліки регіонально рідкісних рослин адміністративних територій України (довідкове виданн-

ня) / Укладачі: Т.Л. Андрієнко, М.М. Перегрим. — К.: Альтерпрес, 2012. — 148 с.
10. Фіторізноманіття заповідників і національних природних парків України. Ч. 1. Біосферні заповідники. Природні заповідники / під ред. В.А. Онищенка і Т.Л. Андрієнко. — К.: Фітосоціоцентр, 2012. — 406 с.
11. Геоботанічне районування УРСР — К.: Наук. думка, 1977. — 304 с.
12. Дідух Я.П. Геоботанічне районування України та суміжних територій / Я.П. Дідух, Ю.Р. Шеляг-Сосонко // Укр. ботан. журн. — 2003. — Т. 60. — № 1. — С. 6-11.
13. Гео-інформаційний сервіс GIS File. — [Електронний ресурс]. — Режим доступу: http://gisfile.com.
14. Український гідрометеорологічний центр. — [Електронний ресурс]. — Режим доступу: http://meteo.gov.ua.
15. Флора Европейской части СРСР. — Т. V: Покрытосеменные: двудольные. — Л.: Наука, 1981. — 380 с.

УДК 615.322 + 582.929.2

Резюме

Грицык А. Р., Свирская С. П.
ГВУЗ «Ивано-Франковский национальный медицинский университет»

Исследование условий произрастания *Anchusa officinalis* L. и *Anchusa procera* Bess. в некоторых регионах Украины

По результатам исследования мест роста ценопопуляций *Anchusa officinalis* L. и *Anchusa procera* Bess. на территории Ивано-Франковской, Тернопольской и Одесской областей установлены экотопические и фитоценотические условия произрастания указанных видов. *A. officinalis* и *A. procera* являются синантропными компонентами флоры, которые растут как на созданных человеком, так и на полуестественных биотопах. Указанные виды в пределах исследуемых фитоценозов являются содоминантами, иногда — ассектаторами. Чаще всего вместе с *A. officinalis* и *A. procera* произрастают *Elytrigia repens* (L.) Nevski и *Achillea submillefolium* Klok. et Krytzka. На основании анализа климатических условий произрастания *A. officinalis* и *A. procera* установлено, что указанные виды произрастают преимущественно в условиях умеренного увлажнения.

Ключевые слова: *Anchusa officinalis*, *Anchusa procera*, растительное сообщество, условия произрастания.

UDC 615.322 + 582.929.2

Summary

Grytsyk A. R., Svirska S. P.
SHEI «Ivano-Frankivsk National Medical University», Ukraine

The investigation of *Anchusa officinalis* L. and *Anchusa procera* Bess. growth conditions in some Ukrainian regions

The ecotopic and phytocenotic growth conditions of populations of *Anchusa officinalis* L. and *Anchusa procera* Bess. were determined based on the results of the study of the growth areas of their populations in Ivano-Frankivsk, Ternopil and Odessa regions. *A. officinalis* and *A. procera* are synanthropic components of the flora that grow both on man-made and semi-natural biotopes. The indicated species typically act as co-dominants and sometimes as assectators within the investigated phytocenosis. It is identified that *Elytrigia repens* (L.) Nevski and *Achillea submillefolium* Klok. et Krytzka typically grow together with *A. officinalis* and *A. procera*. Based on the analysis of the climatic growth conditions, it was found that *A. officinalis* and *A. procera* grow mainly in moderate moisture. Both species are mesoxerophytes and heliophytes. At the same time, *A. officinalis* is a mesophile, whereas *A. procera* is a hyperthermophile. As to the nutrition of soils, both species are mesotrophs.

Keywords: *Anchusa officinalis*, *Anchusa procera*, plant community, growth conditions.

Грицик Андрій Романович. Завідувач кафедри фармації ДВНЗ «Івано-Франківський національний медичний університет», д. фарм. н.(2008), професор (2011).

Свірська Софія Петрівна. Здобувач кафедри фармації ДВНЗ «Івано-Франківський національний медичний університет», магістр фармації (2009).

Будова і властивості

УДК 615.074:543.42:543.632.562

Жук Ю. М., Васюк С. О., Антипенко Л. М.
Запорізький державний медичний університет

Вивчення будови продукту взаємодії бісопрололу з тимоловим синім

На попередньому етапі цього дослідження було розроблено спектрофотометричну методику кількісного визначення бісопрололу фумарату з тимоловим синім у середовищі хлороформу з утворенням забарвленого продукту реакції з максимумом світлопоглинання за 420 нм. У результаті роботи було визначено, що бісопролол взаємодіє з тимоловим синім у стехіометричних співвідношеннях 1:1. Виділений продукт реакції між бісопрололу фумаратом та тимоловим синім було вивчено за допомогою ІЧ- та ^{1}Н ЯМР-спектроскопії. Ідентифікацію та доведення індивідуальності вихідних сполук та продукту реакції проведено хромато-мас-спектрометрично. Доведено, що продуктом реакції між зазначеною лікарською речовиною та відповідним сульфофталеїновим барвником є іонний асоціат.

Ключові слова: бісопролол, тимоловий синій, продукт взаємодії, ІЧ-спектроскопія, ^{1}Н ЯМР-спектроскопія, хромато-мас-спектроскопія.

Сульфофталеїнові барвники вже майже сторіччя добре відомі у хімічному аналізі та використовуються як pH-індикатори завдяки здатності змінювати забарвлення залежно від кислотності розчину. Також ця група барвників широко застосовується як кольорореагенти у спектрофотометрії [1, 2].

У літературі описано багато спектрофотометричних методик кількісного визначення бісопрололу фумарату з різними реагентами [3–9], зокрема й з сульфофталеїновими барвниками [10–11]. Водночас встановлено, що залежно від умов перебігу реакцій утворюються продукти різного складу [3, 11].

Нами було розроблено методику кількісного визначення бісопрололу фумарату в складі лікарських форм на основі його взаємодії з сульфофталеїновим барвником, а саме тимоловим синім (ТС), у середовищі хлороформу [12]. Тому на наступному етапі роботи важливо було встановити, яка сполука утворюється під час взаємодії зазначеного бета-адреноблокатора з тимоловим синім.

Отже, метою роботи стало виділення та ідентифікація продукту взаємодії бісопрололу фумарату з тимоловим синім. Для реалізації цієї мети було поставлено такі задачі:

— встановити стехіометричні коефіцієнти взаємодії бісопрололу фумарату з тимоловим синім;
— виділити продукт взаємодії бісопрололу фумарату з тимоловим синім;
— встановити будову продукту взаємодії бісопрололу фумарату з тимоловим синім.

Матеріали і методи дослідження

Об'єктом дослідження став робочий стандартний зразок (РСЗ) бісопрололу фумарату (Unichem, серія FP/90855).

У роботі було використано реактиви і розчинники: тимоловий синій (кваліфікації чда), хлороформ (кваліфікації чда), гексан (кваліфікації чда).

Загальні методи дослідження:

— стехіометричні коефіцієнти реагуючих речовин встановлювали методом насичення (методом молярних співвідношень) та методом неперервних змін (методом ізомолярних серій);
— ІЧ-спектри знімали на спектрофотометрі Bruker Alpha (Bruker Optik GmbH, Ettlingen, Germany) в області 7500–400 $см^{-1}$ з використанням приставки ATR (пряме уведення речовини);
— ^{1}Н ЯМР-спектри отримували на спектрофотометрі ядерного магнітного резонансу Varian-Mercury 400 (Varian Inc., Palo Alto, CA, USA) (400 МГц), розчинник — DMSO-d_6, внутрішній стандарт — тетраметилсилан;
— хромато-мас-спектри отримували на високоефективному рідинному хроматографі Agilent 1200 Series (Agilent, Palo Alto, CA, USA), оснащеному діодно-матричним та масселективним детектором Agilent LC/MSD SL. Спосіб іонізації — хімічна іонізація за атмосферного тиску (APCI). Режим іонізації — одночасне сканування позитивних та негативних іонів у діапазоні мас 80–1000 *м/з*. Колонка — Zorbax SB-C18 1.8 μm 4.6 × 15 mm Rapid Resolution cartridge (PN 821975-932). Рухома фаза: А — ацетонітрил, 0.1% мурашина кислота; В — вода (0.1% мурашина кислота);
— спектри поглинання забарвлених продуктів реакцій у видимій області спектра отримували на спектрофотометрі Specord 200 (Німеччина) (190–1100 нм). Одержані спектри обробляли, застосовуючи програмний пакет WinASPECT 2.2.1.0.

Результати досліджень та їх обговорення

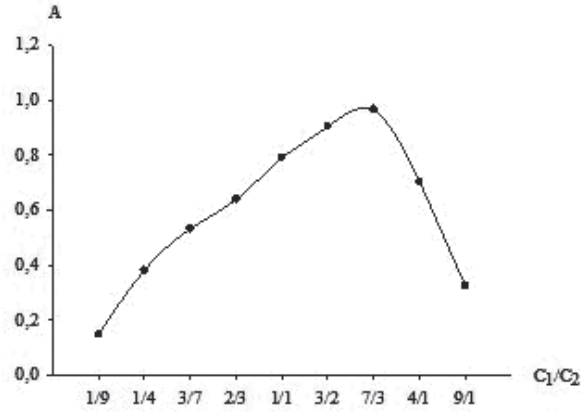
Визначення стехіометричних коефіцієнтів реагуючих компонентів у реакції між бісопрололу фумаратом та тимоловим синім

Для встановлення стехіометричних коефіцієнтів реагуючих компонентів у реакції між бісопрололу фумаратом та тимоловим синім були використані найбільш поширені методи: метод неперервних змін (метод ізомолярних серій) та метод насичення (метод молярних співвідношень).

Метод неперервних змін ґрунтується на визначенні співвідношень ізомолярних концентрацій реагуючих речовин, що відповідає максимальному виходу сполук, які утворюються в результаті реакції. Для виконання аналізу готували розчини реагенту та досліджуваної лікарської речовини однакової молярної концентрації (0.002 М) та змішували їх в антибатних співвідношеннях, проте загальний об'єм розчину залишався незмінним.

Реакцію проводили згідно з розробленою методикою [12]. Вимірювання абсорбції отриманих розчинів проводили за обраною аналітичною довжиною хвилі. За отриманими даними було побудовано графік залежності величини оптичної густини від співвідношення об'ємів компонентів ізомолярних серій (Рис. 1).

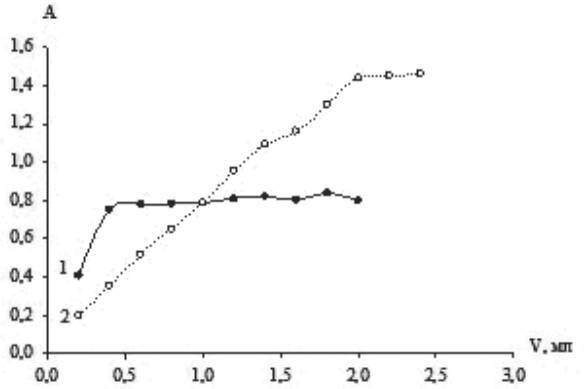
Рисунок 1



Графік залежності оптичної густини від складу ізомолярного розчину (C_1 — 0.002 М розчин ТС, C_2 — 0.002 М розчин бісопрололу фумарату) за 420 нм

В основі методу молярних співвідношень лежить встановлення залежності оптичної густини від концентрації одного з компонентів реакційної суміші за постійної концентрації другого компонента і навпаки. Точка перегину на кривій насичення відповідає відношенню концентрацій реагуючих сполук та дорівнює стехіометричному коефіцієнту компонента, концентрація якого змінювалася (Рис. 2).

Рисунок 2



Криві насичення: 1 — бісопрололу фумарату за постійної концентрації ТС (1.00 мл 0.002 М розчину); 2 — ТС за постійної концентрації бісопрололу фумарату (1.00 мл 0.002 М розчину)

Як видно з Рис. 1 та 2, бісопрололу фумарат взаємодіє з ТС у співвідношенні 1:2, але зважаючи на те, що до складу молекули бісопрололу фумарату входить два катіона бісопрололу, продукт реакції містить монокатіон бісопрололу та моноаніон ТС. Отже, бісопролол взаємодіє з ТС у співвідношенні 1:1.

Виділення продукту взаємодії бісопрололу фумарату з тимоловим синім.

Відповідно до встановлених стехіометричних коефіцієнтів компонентів реакції було виділено забарвлений продукт взаємодії бісопрололу фумарату з тимоловим синім.

Загальна методика виділення продукту реакції: 76.69 мг (0.0001 моль) бісопрололу фумарату розчиняли у 5.00 мл хлороформу, додавали розчин 95.12 мг (0.0002 моль) ТС у 5.00 мл хлороформу, перемішували та залишали на 30 хв за кімнатної температури. До суміші додавали *н*-гексан до помутніння та залишали для викристалізації на 24 год. Осад відфільтровували крізь паперовий фільтр «синя стрічка», промивали декілька разів *н*-гексаном та сушили за кімнатної температури. Виділений продукт реакції являє собою цегляно-червоні кристали, розчинні у хлороформі, метанолі, етанолі, ацетоні та ДМСО, мало розчинні у воді, нерозчинні у *н*-гексані. Вихід одержаної сполуки становить 147.31 мг (85.74 %).

Ідентифікація продукту взаємодії бісопрололу фумарату з тимоловим синім.

Для підтвердження того, що продуктом реакції між бісопрололу фумаратом та тимоловим синім є іонний асоціат, було проведено

Рисунок 3

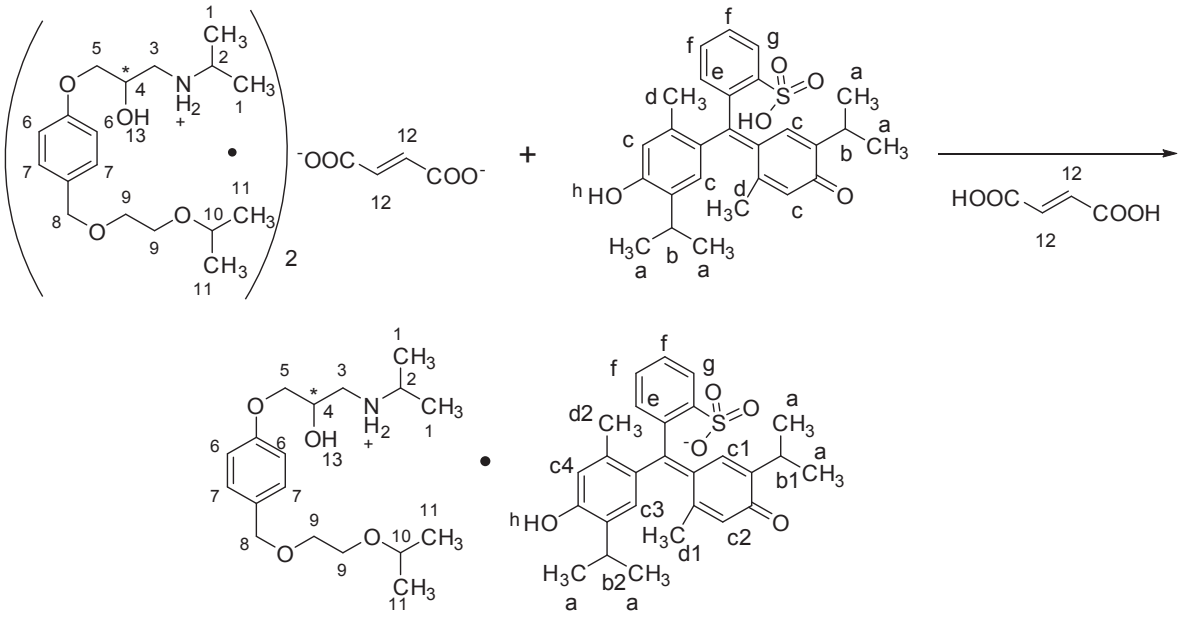


Схема взаємодії бісопрололу фумарату з тимоловим синім

ІЧ-спектрометричне дослідження бісопрололу фумарату, тимолового синього та продукту їх взаємодії (Рис. 3).

Вихідні сполуки та іонний асоціат характеризуються наявністю усіх відповідних валентних та деформаційних коливань згідно із запропонованими структурами (Табл. 1).

Так, у ІЧ-спектрі продукту реакції спостерігається гіпсохромний зсув сигналу карбонільної, сульфо-, ефірної груп та метильних замісників. Протонування вторинної амінної групи бісопрололу підтверджується валентними коливаннями, що фіксуються за 2746 та 1574 $см^{-1}$. Набуває малої інтенсивності та уширюється сигнал валентного коливання ОН-групи, а валентні коливання ароматичних кілець набувають незначного батохромного зсуву. Що стосується деформаційних коливань СН-, СО-, CN- та CS-зв'язків, то вони присутні з відповідною інтенсивністю в області 1300 – 600 $см^{-1}$.

Для ідентифікації та доведення індивідуальності вихідних сполук та вивчення продукту реакції було хромато-мас-спектрометрично досліджено бісопрололу фумарат і ТС, а також утворений ними продукт реакції, за умови розчинення досліджуваної речовини та реагенту у співвідношенні 1:1 у середовищі хлороформу для сприяння формуванню та послабленню іонізації утвореного іонного асоціату.

Одержані хроматограми доводять, що чистота вихідних сполук становить 100 %. На хроматограмі продукту реакції бісопрололу фумарат – тимоловий синій у середовищі хлороформу реєструвалися два піки у співвідношенні один до чотирьох, а саме *m/z* 325 бісопрололу (22 %) на *m/z* 466 (78 %) тимолового синього, з часом

Таблиця 1

Характеристичні смуги та тип коливань у ІЧ-спектрах досліджуваних сполук, $см^{-1}$

Група	Бісопролол		Тимоловий синій		Продукт	
-OH	3114	х	3054	х	3247	—
$-COO^-$	1609	$х_{as}$	—	—	1603	$х_{as}$
	1334	$х_{s}$	—	—	1335	$х_{s}$
-C-O-C	1082	х	—	—	1077	х
-C=O	—	—	1746	х	1621	х
$-SO_3H/-SO_3^-$	—	—	1240	$х_{as}$	1231	$х_{as}$
	—	—	1083	$х_{s}$	1082	$х_{s}$
$-NH_2^+$	2717	х	—	—	2746	х
	1566	д	—	—	1574	д
$-C(CH_3)_2$	1366	д	1378	д	1343	д
Ar кільце	1565	х	1555	х	1574	х

виходу, що відповідає вихідним сполукам. Враховуючи, що субстанція є фумаратом, реакція протонування тимоловим синім проходить як за аміногрупою бісопрололу, так і двома карбоксильними залишками фумарової кислоти, тобто з однією молекулою основи бісопрололу реагує одна молекула реагенту у співвідношенні 1:1.

Крім того, нещодавнє дослідження A.D. Panainte *et al*. про взаємодію бісопрололу фумарату з бромкрезоловим зеленим також показало співвідношення бісопрололу основи та реагенту як 1:1 [11].

Для однозначного доведення утворення іонного асоціату було знято ^{1}H ЯМР-спектри для бісопрололу фумарату та продукту реакції між бісопрололу фумаратом та ТС. Для кращої інтерпретації результатів ^{1}H ЯМР-спектрів на Рис. 3 усі протони бісопрололу та тимолового синього було пронумеровано цифрою та буквою відповідно, сигнали та розщеплення яких відповідали запропонованим структурам та даним літератури.

Таблиця 2

Хімічні зсуви у ^{1}H ЯМР-спектрах досліджуваних сполук, м.ч.

Бісопролол		**Тимоловий синій**		**Продукт**	
Хімічний зсув, м.ч., кількість Н, мультипл., *J*, Гц	Номер атома	Хімічний зсув, м.ч., кількість Н, мультипл., *J*, Гц	Номер атома	Хімічний зсув, м.ч., кількість Н, мультипл., *J*, Гц	Номер атома
—	—	—	—	0.83 (3H), с	d2
—	—	0.98 (12H), дд, *J* = 18.6; 6.8 Гц	a	0.98, 0.94 (12H), дд, *J* = 16.8; 6.7 Гц	a
1.09, (12H), д, *J* = 6.1 Гц	11	—	—	1.10 (12H), д, *J* = 6.1 Гц	11
1.15 (12H), дд, *J* = 16.6; 4.4 Гц	1	—	—	1.25, 1.57 (12H), дд, *J* = 16.6; 4.4 Гц	1
—	—	1.91 (6H), с	d	2,07 (3H), д *J* = 13.0 Гц	d1
2.77, 2.92 (4H), дд, *J* = 11.4; 7.1 Гц	3	—	—	2.98 – 2.95 (4H), м	3
3.09 – 3.05 (2H), м	2	3.04 (2H), гепт., *J* = 6.8 Гц	b	3.08 – 3.06 (4H), м	2, b
3.48 (8H), с	9	—	—	3.49 (8H), с	9
3.61 – 3.51 (2H), м	10	—	—	3.55 (2H), гепт. *J* = 6.0 Гц	10
3.90 (4H), дд, *J* = 12.4; 7.1 Гц	5	—	—	3.95 (4H), дд, *J* = 9.6; 5.3 Гц	5
4.06 – 4.02 (2H), м	4	—	—	4.15 – 4.10 (2H), м	4
4.39 (4H), с	8	—	—	4.41 (4H), с	8
—	—	—	—	5.94 (2H), дс	12
6.42 (2H), с	12	—	—	—	—
—	—	—	—	6.56 – 6.52 (2H), м, уш.	13
—	—	6.61 (4H), с	c	6.63 (1H), с	c4
—	—	—	—	6.78 – 6.75 (3H), м	c1 – 3
6.88 (4H), д *J* = 8.5 Гц	6	—	—	6.90 (4H), д, *J* = 8.4 Гц	6
—	—	7.06 (1H), дд, *J* = 5.6; 3.0 Гц	e	7.07 – 7.02 (1H), м, уш.	e
7.21 (4H), д, *J* = 8.4 Гц	7	—	—	7.23 (4H), д, *J* = 8.2 Гц	7
—	—	7.70-7.65 (2H), м	f	7.39 – 7.35 (1H), м, уш.; 7.64 (1H), д, *J* = 6.8 Гц	f
—	—	7.97 (1H), дд, *J* = 5.6; 3.1 Гц	g	7.94 – 7.90 (1H), м	g
—	—	—	—	8.23 (1H), с	OH h
—	—	—	—	9.17 (1H), с	COOH

^{1}Н ЯМР-спектри досліджуваних сполук та отриманого продукту реакції довели їх будову згідно з хімічними зсувами сигналів протонів та їх відповідною мультиплетністю (Табл. 2). Внаслідок наявності великої кількості ароматичних протонів як у бісопрололу, так і у тимолового синього, що значною мірою ускладнює інтерпретацію спектрів продуктів реакції, було проаналізовано дані літератури для однозначного віднесення того чи іншого сигналу до відповідного протона [13].

^{1}Н ЯМР-спектр бісопрололу фумарату характеризується наявністю подвійної кількості усіх протонів, через присутність рацемічної суміші його двох енантіомерів (Рис. 3), що також підтверджується даними літератури [13]. Крім того, його обмінні протони ОН- та NH-груп не спостерігались через дейтерообмін з ДМСО-*d6*.

Основними маркерами утворення іонних асоціатів є хімічні зсуви сигналів 3—5 протонів бісопрололу, на які впливає протонування аліфатичної компоненти молекули субстанції кислим протоном сульфогрупи тимолового синього.

Більшість ароматичних фенільних протонів бісопрололу внаслідок утворення іонної пари фіксуються як нерозщеплені мультиплети. Деякі сигнали еквівалентних метильних протонів, навпаки, зазнають розщеплення.

Висновки

У результаті роботи було встановлено, що бісопрололу фумарат взаємодіє з тимоловим синім у співвідношенні 1:1, а також виділено та встановлено будову продукту взаємодії бісопрололу фумарату з тимоловим синім. За допомогою ІЧ- та ^{1}Н ЯМР-спектроскопії підтверджено, що продуктом реакції є іонний асоціат.

ЛІТЕРАТУРА

1. Prashanth K.N. Rapid and Sensitive Spectrophotometric Measurement of Non-Specific Beta Blocker Propranolol Hydrochloride Using Three Sulphonphthalein Dyes In Pure Form, Pharmaceuticals and Human Urine / Prashanth K.N., Basavaiah K., Raghu M.S. // Chemical Sciences Journal. — 2012. — Vol. CSJ-80. — http://astonjournals.com/csj.

2. Tripti Sharma. Extractive Spectrophotometric Determination of Nebivolol Hydrochloride in Pharmaceutical Formulation and Biological Fluids / Tripti Sharma, Dannana Gowrisankar, Sudam Chandra Si // Int. J. PharmTech Res. — 2014. — Vol. 6, № 5. — P. 1571-1579.

3. Ulu S.T. Spectrophotometric determination of bisoprolol in pharmaceutical preparations by charge transfer reactions / S.T. Ulu, E. Kel // Optics and Spectroscopy. — 2012. — Vol. 112, № 6. — P. 864-867.

4. Spectrofluorimetric and Spectrophotometric Determination of Irbesartan and Bisoprolol hemifumarate independently in their Tablets / Afaf A. Abdelmonem, Gamal H. Ragab, Hisham A. Hashem, Eman A. Bahgat // UK Journal of Pharmaceutical and Biosciences. — 2016. — Vol. 4, № 2. — P. 43-52.

5. Пат. на корисну модель 67203 Україна, МПК G01N 21/78. Спосіб кількісного визначення бісопрололу фумарату в таблетках / Тарханова О.О., Шара Є.О., Васюк С.О. — № u2011 08150; заявл. 29.06.11; опубл. 10.02.12, Бюл. № 3.

6. A novel spectrophotometric determination of atenolol using sodium nitroprusside / Nadia Bashir, S W H Shah, Masroor Bangesh, Riazullah // Journal of Scientific & Industrial Research. — 2011. — Vol. 70. — P. 51-54.

7. Gudruman A.D. Spectrophotometric determination of bisoprolol using methyl orange as reagent / Gudruman A.D., Murarasu A., Dorneanu V. // Farmacia. — 2012. — Vol. 60, № 5. — P. 634-641.

8. Utility of complexation reaction for the determination of some cardiovascular drugs / Ayad M., Abdellatef H., Hosny M., Sharaf Y. // Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research. — 2013. — Vol. 6, № 1. — P. 92-102.

9. Spectrophotometric method for estimation of bisoprolol fumarate in tablets / Panainte A.D., Bibire N., Tвntaru G. [et al.] // Rev. Med. Chir. Soc. Med. Nat. Iasi. — 2014. — Vol. 118, № 2. — P. 558-563.

10. Akram M. El-didamony. Extraction-spectrophotometric determination of some antihypertensive drugs in pharmaceutical and biological fluids using two sulphonphthalein dyes / Akram M. El-didamony, Sameh M. Hafeez, Ahmed A. Saad // International Journal of Applied Farmaceutics. — 2015. — Vol. 7, № 1. — P. 10-17.

11. A new method for the assay of bisoprolol using bromcresol green / Panainte A.D., Bibire N., Tвntaru G. [et al.] // Rev. Chim. — 2014. — Vol. 65, № 8. — P. 916-920.

12. Жук Ю.М. Спектрофотометричне визначення бісопрололу за реакцією з тимоловим синім / Жук Ю.М., Васюк С.О., Кейтлін І.М. // Запорізький медичний журнал. — 2012. — Вип. 72. — № 3. — С. 62-64.

13. Zielinska-Pisklak M.A. ^{1}H and ^{13}C NMR characteristics of в-blockers / Zielinska-Pisklak M.A., Pisklak D.M., IwonaWawer // Magnetic Resonance Chemistry. — 2011. — № 49. — P. 284-290.

УДК 615.074:543.42:543.632.562

Резюме

Жук Ю. Н., Васюк С. А., Антипенко Л. Н.
Запорожский государственный медицинский университет

Изучение строения продукта взаимодействия бисопролола с тимоловым синим

На предварительном этапе данного исследования была разработана спектрофотометрическая методика количественного определения бисопролола фумарата с тимоловым синим в среде хлороформа с образованием окрашенного продукта с максимумом светопоглощения при 420 нм. В результате работы было определено, что бисопролол реагирует с тимоловым синим в стехиометрических соотношениях 1:1. Выделенный продукт реакции между бисопролола фумаратом и тимоловым синим был изучен с помощью ИК- и ^{1}Н ЯМР-спектроскопии. Идентификация и доказательство индивидуальности исходных веществ и продукта реакции проведены хромато-масс-спектрометрически. Доказано, что продуктом реакции между указанным лекарственным веществом и соответствующим сульфофталеиновым красителем является ионный ассоциат.

Ключевые слова: бисопролол, тимоловый синий, продукт взаимодействия, ИК-спектроскопия, ^{1}Н ЯМР-спектроскопия, хромато-масс-спектроскопия.

UDC 615.074:543.42:543.632.562

Summary

Zhuk Y. M., Vasyuk S. O., Antipenko L. M.
Zaporizhzhya State Medical University

Research of the structure of bisoprolol with thymol blue interaction product

Preliminary to the study, the spectrophotometric procedure for the quantitative determination of bisoprolol fumar-

ate with thymol blue in chloroform, with the formation of a coloured product with the maximum absorbance wavelength at the 420 nm in the concentration ranges of 2.5-3.75 mg/100ml of bisoprolol, was developed. In the presented study, the stoichiometric coefficients of bisoprolol fumarate and thymol blue were determined by the isomolar series and molar ratio methods. It was determined that bisoprolol interacts with thymol blue in the stoichiometric ratio of 1:1. The product of the interaction was isolated in pure form, in the form of brick-red crystals. The study of the solubility has shown that it is slightly soluble in water, insoluble in *n*-hexane, soluble in chloroform, methanol, ethanol, acetone, and DMSO. The identification and purity of starting compounds as well as the product of their interaction were studied using LC-MS, IR and ^{1}H NMR spectroscopy. The purity of the starting compounds was shown to be 100 %. It was found that the product of the reaction between bisoprolol fumarate and the corresponding sulfonphthalein dye was an ionic associate.

Keywords: bisoprolol, thymol blue, interaction product, IR-spectroscopy, ^{1}H NMR-spectroscopy, chromatography-mass spectroscopy.

Жук Юлія Миколаївна. Асистент кафедри аналітичної хімії Запорізького державного медичного університету, к. фарм. н.

Васюк Світлана Олександрівна. Завідувач кафедри аналітичної хімії Запорізького державного медичного університету, д. фарм. н., професор.

Антипенко Людмила Миколаївна. Post Doc, Department of Applied Sciences, Hochschule Neubrandenburg Germany, PhD of Pharmacy.

Фармако-економічні та маркетингові дослідження

УДК 615.12:339.187.2

Півень О. П., Ткаченко І. В., Шуванова О. В.
Національний фармацевтичний університет

Дослідження клієнтів аптечного закладу за компонентами лояльності

Керівникам аптечних установ важливо мати сукупність інструментів, що дозволяють проводити адекватну оцінку лояльності своїх клієнтів і своєчасно вживати заходів щодо її поліпшення, за необхідності. Метою статті є проведення оцінки лояльності клієнтів до аптечного закладу за компонентами лояльності та інтерпретація результатів дослідження. Запропоновано здійснювати оцінку лояльності клієнтів до аптечного закладу за такими компонентами лояльності, як поведінкова, ставлення, намірів, а також здійснювати комплексну оцінку з використанням різних методів дослідження. Обґрунтовано, що за 10-бальною шкалою рівню обслуговування в аптеці, що сприймається споживачами (7.9 балів), відповідає ступінь їхньої задоволеності (8.1 балів). Інтегральна оцінка лояльності клієнтів, отримана за методикою на основі концепції Servqual (15.2 % опитаних), близька до оцінки за поведінковою компонентою лояльності на основі аналізу скарг клієнтів (15.5 % опитаних). Визначено, що за компонентою ставлення у якості лояльних можуть розглядатися 23 % цілком задоволених клієнтів, а за компонентою намірів (на підставі розрахунку чистого індексу промоутерів (NPS)) — 20 %. Використання різних методів оцінки лояльності клієнтів, що відображають окремі її компоненти або їх сукупність (комплексні методи), показало, що встановлений рівень лояльності в досліджуваній аптеці характеризується відносно незначним варіюванням — від 15.2 % до 23 %. Це свідчить про те, що запропонована методологія і використані методи дослідження є адекватними для оцінки лояльності клієнтів.

Ключові слова: лояльність покупців, компоненти лояльності, поведінкова компонента, компонента відносин, компонента намірів, методи оцінки лояльності, аптечний заклад.

На сьогодні встановлення тривалих довірчих відносин з клієнтами, формування їхньої лояльності розглядається як стратегічний напрямок маркетингу підприємства, який забезпечує його конкурентоспроможність і подальший сталий розвиток на ринку [1]. Лояльність клієнтів — це багатогранне комплексне поняття, яке відображає як поведінкову, так і емоційну складову ставлення споживача до підприємства. Лояльному клієнтові притаманні такі ознаки, як прихильність до підприємства, задоволеність товарами та послугами, здійснення повторних покупок, готовність давати позитивні оцінки діяльності підприємства та рекомендувати його своєму оточенню, нечутливість до привабливих пропозицій з боку підприємств-конкурентів, довгострокові відносини [2-4]. Лояльний клієнт завдяки своєму прихильному ставленню сприяє поширенню позитивної інформації про підприємство, підвищенню його іміджу, розширенню кола відвідувачів, що позитивно відбивається на результатах діяльності підприємства. Саме тому менеджери підприємства мають приділяти особливу увагу відносинам з клієнтами, якісному обслуговуванню, формуванню і проведенню оцінки їхньої лояльності. Для цього менеджерам необхідно володіти сукупністю методичних підходів та інструментів, які б дозволяли проводити адекватну оцінку лояльності своїх клієнтів, зокрема за основними компонентами лояльності, та своєчасно вживати заходів з усунення виявлених недоліків. У результаті визначення підприємством лояльності своїх клієнтів на постійній основі буде сприяти покращенню їх обслуговування та підвищенню ефективності його роботи.

Аналіз останніх досліджень і публікацій

Питанню оцінки лояльності клієнтів присвячена велика кількість наукових праць, що свідчить про актуальність цього напряму [4-16]. Науковці пропонують різні підходи і методи оцінки лояльності, які спрямовані на відображення як окремих її характеристик, так і на їх сукупність. Проте зазвичай виділяють два підходи до визначення лояльності клієнта. Перший підхід ґрунтується на розгляді лояльності як певного типу поведінки клієнта, що виражається в тривалих відносинах з підприємством і здійсненні повторних покупок. Другий підхід базується на розгляді лояльності як переваги споживачів, їхньої задоволеності, що формується в результаті узагальнення уявлення, емоцій, почуттів щодо підприємства (товару, послуги) [2, 5].

Як основні компоненти лояльності зазначають поведінкову, пов'язану зі ставленням і намірами, а також їх поєднання. Основним компонентам лояльності відповідають визначені типи лояльності: поведінкова лояльність; лояльність, пов'язана зі ставленням; лояльність, пов'язана з намірами; комплексна лояльність. Відповідно до існуючих типів лояльності споживачів виокремлюють підходи до її оцінки: на основі поведінкової лояльності, на основі лояльності, пов'язаної зі ставленням, на основі намірів, комплексний підхід. У кожного з цих

підходів є свої переваги та недоліки, і залежно від того, яка компонента лояльності є пріоритетною у дослідженнях (поведінкова, ставлення, намірів або їх комбінація), використовують відповідні підходи, методи, прийоми та показники [2, 4, 5].

Визначення поведінкової компоненти лояльності здійснюється на основі поведінки клієнтів з урахуванням частоти та вартості покупок. Широкого поширення за компонентою ставлення набули методи оцінки лояльності, що засновані на визначенні задоволеності клієнтів (товаром, обслуговуванням) [6-9], оскільки лояльним може бути тільки повністю задоволений клієнт. За компонентою намірів найбільшого поширення набула методика Net Promoter Score (NPS), яка дозволяє визначити чистий індекс промоутерів [10, 11]. Серед комплексних методів оцінки лояльності клієнтів перевагу набуває концепція якісного сервісу — Servqual [12, 13]. Для оцінки лояльності клієнтів до фармацевтичного підприємства як методи, що відображають ставлення або наміри, пропонується використовувати показник задоволеності клієнтів та NPS-методику відповідно, як комплексний метод — концепцію Servqual [4].

Виділення не вирішених раніше частин загальної проблеми

Незважаючи на значну кількість наукових публікацій стосовно видів лояльності клієнтів, факторів її формування, підходів та методів оцінки, комплексних досліджень щодо визначення лояльності клієнтів до фармацевтичного підприємства за основними її компонентами та аналізу їх співставлення не проводилось.

Мета

Проведення оцінки лояльності клієнтів до аптечного закладу за компонентами лояльності й інтерпретація результатів дослідження.

Матеріали та методи

Як матеріали використано наукові публікації та опитувальні листи (анкети) споживачів стосовно теми дослідження. У процесі проведення досліджень були використані метод опитування, метод статистичної обробки результатів анкетування, метод статистичного групування (для визначення чистого індексу промоутерів), аналітичний метод, метод маркетингового шкалювання, метод Net Promoter Score (індекс готовності рекомендувати — NPS), методика інтегральної оцінки лояльності клієнтів за концепцією Servqual [14].

Методика оцінки лояльності клієнтів до аптечного закладу за компонентами лояльності складається з таких етапів [15]:

— визначення методів, за якими буде проводитись оцінка лояльності клієнтів;
— розробка питань для анкети відповідно до основних компонентів лояльності клієнтів;
— вибір єдиної шкали для забезпечення порівнянності отриманих результатів за відповідними питаннями;
— розробка опитувального листа (анкети);
— визначення вибірки і проведення опитування;
— обробка і аналіз результатів анкети;
— визначення лояльності клієнтів за компонентами лояльності за результатами обробки анкети;
— визначення комплексної лояльності відповідно до методичних рекомендацій «Оцінка лояльності клієнтів до аптечного закладу на основі концепції Servqual» [14];
— інтерпретація результатів.

Для проведення дослідження лояльності клієнтів до аптечного закладу за компонентами лояльності була розроблена анкета, до якої увійшли три групи питань відповідно до основних компонентів лояльності: поведінкова компонента, компонента ставлення і компонента намірів. З метою визначення достовірності відповідей респондентів були використані питання-фільтри.

Для визначення поведінкової компоненти лояльності до анкети були включені питання, які характеризують: постійність користування послугами досліджуваної аптеки, частоту здійснення покупок у аптеці, наявність повторних покупок, тривалість користування послугами досліджуваної аптеки, частоту відмов від покупки дорогого препарату, мету відвідування інших аптек, середню вартість чека при купівлі товару, оформлення скарг у Книзі скарг і пропозицій тощо.

Для визначення компоненти лояльності, пов'язаної зі ставленням, до анкети були включені питання, які характеризують: ступінь задоволеності обслуговуванням у аптеці, оцінку іміджу аптеки, перевагу обслуговування в досліджуваній аптеці, ставлення до оформлення скарг у Книзі скарг і пропозицій.

Для визначення компоненти лояльності, пов'язаної із намірами, до анкети були включені питання, які характеризують: готовність користуватися послугами в подальшому, готовність рекомендувати досліджувану аптеку своєму оточенню, готовність піти до іншої аптеки за покупкою, де вона буде дешевшою, мотиви оформлення скарг у Книзі скарг і пропозицій.

Для забезпечення порівнянності отриманих результатів було обрано єдину шкалу (10-бальну), яка була використана у відповідних питаннях. Для всіх відносних показників, що вимірюються у відсотках, для забезпечення співставлення за базу визначення відсотка була взята загальна кількість опитаних. Дослідження було проведене в грудні 2016 р. на базі самостійної аптеки в м. Харків. Для визначення обсягу вибірки за основу було прийнято, що допустима межа похибки у маркетингових дослідженнях становить 10 %, варіація — 50 %, коефіцієнт довіри — 1.96. Необхідний обсяг вибірки становив 96 респондентів. Оцінку лояльності клієнтів до аптечного закладу проведено на підставі обробки 369 анкет. Серед опитаних 60 % становили жінки, 40 % — чоловіки.

Результати досліджень та їх обговорення

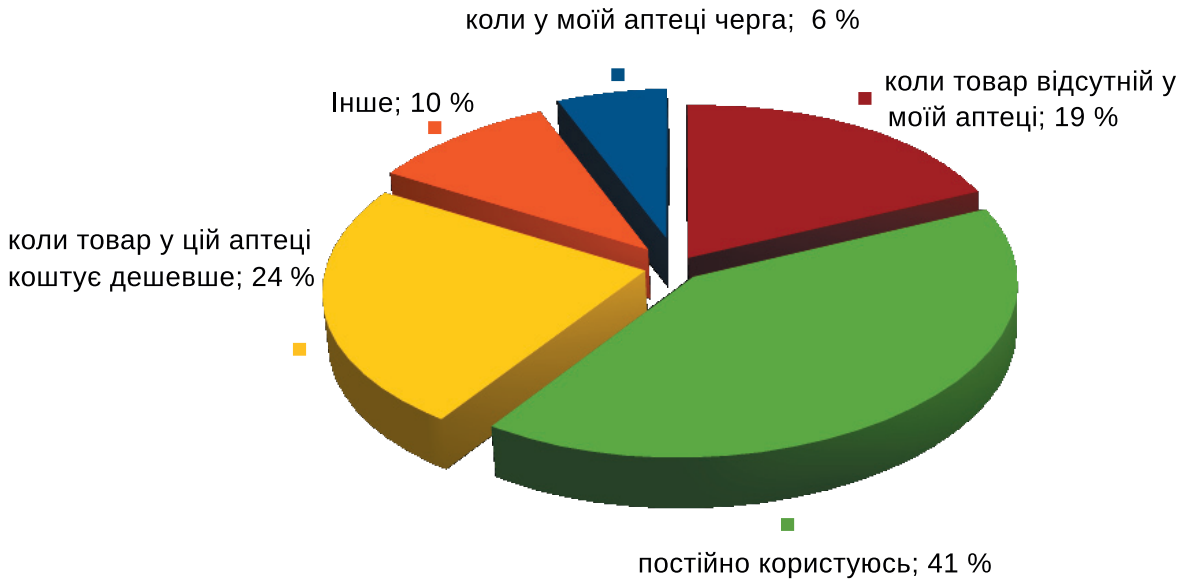
Аналіз лояльності відвідувачів аптеки за поведінковою компонентою показав, що аптекою, де проводилися дослідження, постійно користуються 41 % опитаних (Рис. 1). На питання «Чи заходите Ви до інших аптек, окрім тієї, якою завжди користуєтесь?» була отримана відповідь, що тільки 19 % респондентів користуються однією аптекою, 42 % — двома, 39 % — трьома та більше. Водночас для 33 % опитаних не має значення, в якій аптеці купувати фармацевтичну продукцію. Найчастіше мотивом відвідання інших аптек є отримання інформації щодо рівня цін на лікарські препарати (62 %) й ознайомлення з асортиментом (38 %). Майже половина опитуваних (46 %) часто вимушені відмовляти собі у придбанні дорогих препаратів, віддаючи перевагу більш дешевим аналогам.

За тривалістю відвідування досліджуваної аптеки респонденти поділились таким чином. Ті з них, що відвідують аптеку більше 3 років, становлять 33 %. Відповідно на долю тих, що відвідують аптеку не більше 3 років, випадає 67 %. За частотою здійснення покупок в аптеці найбільша частка випадає на респондентів, які відвідують аптеку 1 раз на місяць (35 %), другий показник (24 %) — 2 рази на місяць. Один раз на тиждень аптеку відвідує 21 % респондентів. Тобто серед опитаних 80 % відвідують аптеку 1 раз на місяць або частіше. Саме ці споживачі становлять для аптеки найбільшу цікавість щодо формування лояльності клієнтів. Більшість з них (83 % опитаних) роблять повторні покупки (дві та більше покупок того самого товару). Проте у 72 % респондентів величина вартості чека не перевищує 200 грн.

Аналіз лояльності відвідувачів аптеки за компонентою ставлення показав, що 71 % опитаних віддають перевагу досліджуваній аптеці порівнюючи з іншими аптеками, які знаходяться у цьому районі. Приблизно однакова кількість респондентів вважає, що досліджувана аптека має середній (49 %) або високий імідж (47 %) (Рис. 2).

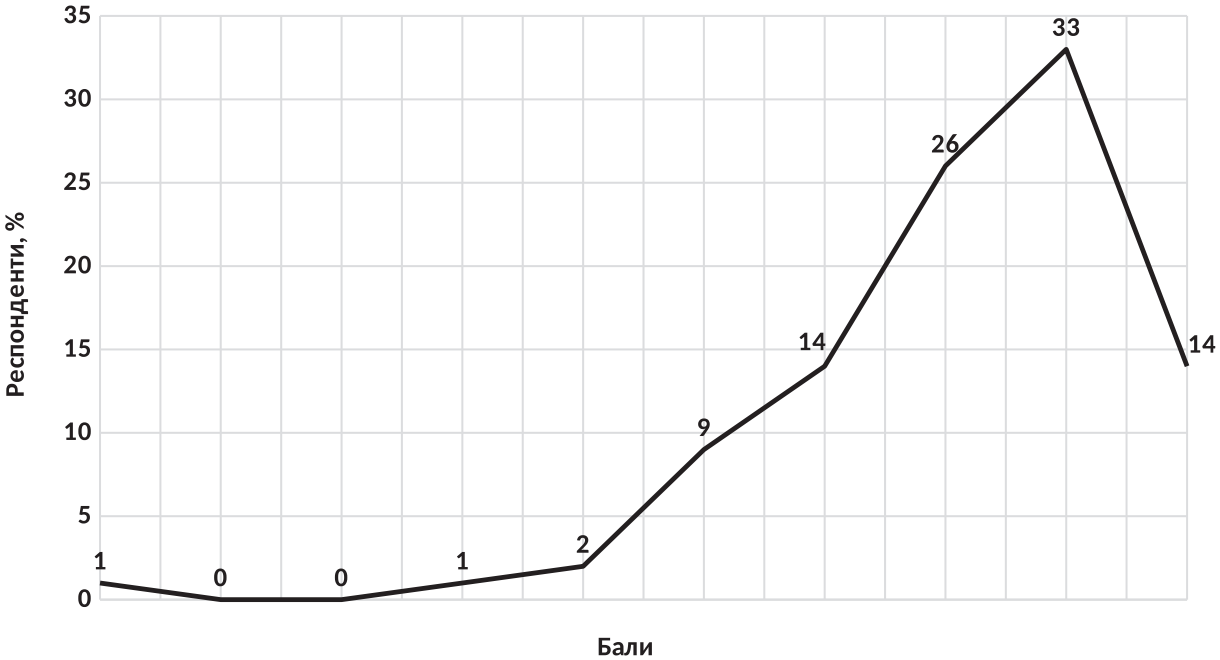
Як критерій ставлення споживачів до аптечного закладу пропонується використовувати ступінь їхньої задоволеності обслуговуванням у аптеці. Ступінь задоволеності споживачів залежить від сприйнятого ними рівня обслуговування в аптеці. У зв'язку з викладеним нами проведено аналіз сприйманого споживачами рівня обслуговування у досліджуваній аптеці відповідно до науково-методичних рекомен-

Рисунок 1



Випадки, у яких респонденти користуються досліджуваною аптекою

Рисунок 2



Оцінка респондентами іміджу досліджуваної аптеки в балах

дацій «Оцінка лояльності клієнтів до аптечного закладу на основі концепції Servqual» [14]. Результати дослідження наведено у Табл. 1.

Отже, інтегральний показник сприйманого споживачами рівня обслуговування, який розраховано як середнє арифметичне сприйманого рівня обслуговування за групами показників (за 10-бальною шкалою), дорівнює 7.9 балам.

Для визначення ступеня задоволеності обслуговуванням у досліджуваній аптеці респондентам було запропоновано провести оцінку за 10-бальною шкалою. Результати досліджень показали, що 42 % респондентів вважають себе повністю задоволеними обслуговуванням у цій аптеці (Рис. 3). Частка повністю задоволених постійних клієнтів становить 23 % (від загальної кількості опитаних). Тобто за критерієм задоволеності ставлення до аптеки повністю задоволених постійних споживачів може вважатися лояльним.

Визначення узагальненого показника задоволеності опитаних обслуговуванням у аптеці здійснювалося на основі методу маркетингового шкалювання з використанням 10-бальної шкали [15, 16]:

$$З = \frac{\sum_{i=1}^{n} a_i x_i}{\sum_{i=1}^{n} x_i}, \qquad (1)$$

де З — рівень задоволеності відвідувачів досліджуваного аптечного закладу;

x_i — кількість опитаних відвідувачів, які свою задоволеність визначили на рівні a_i-го балу;

a_i — бал, що характеризує рівень задоволеності опитаного, i = 1, 2, ..., n балів;

n — величина бальної системи, що обрана для проведення дослідження.

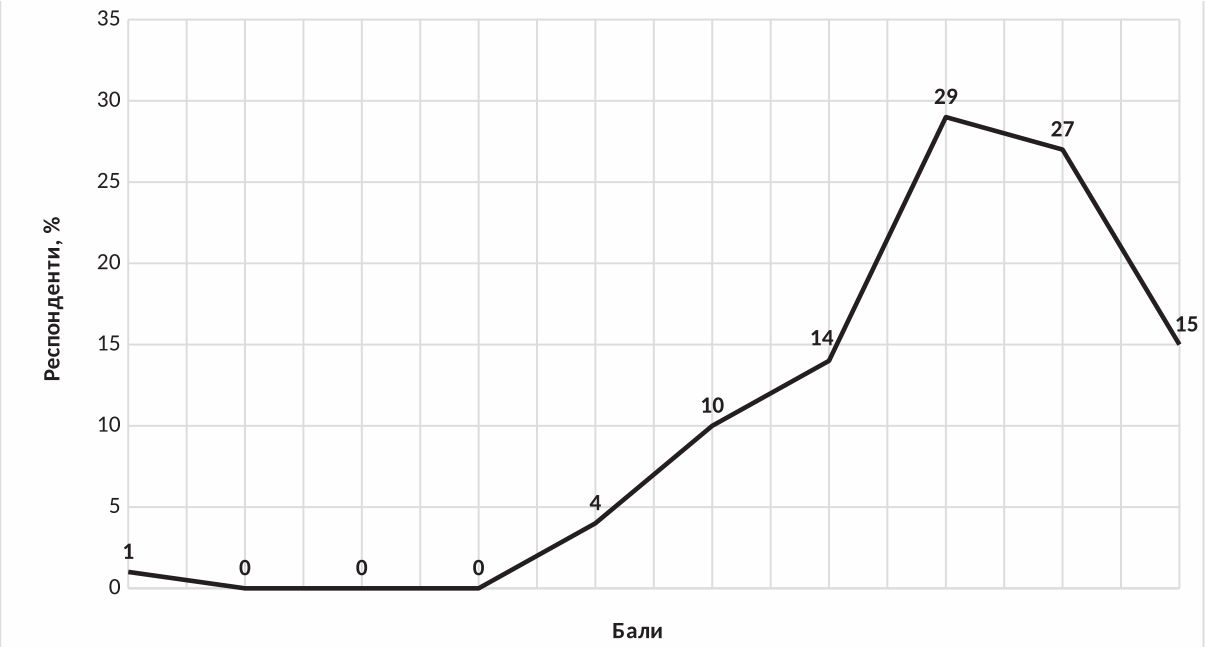
Розрахунки показали, що узагальнений ступінь задоволеності клієнтів дорівнює 8.1 балам,

Таблиця 1

Сприйманий споживачами рівень обслуговування у досліджуваній аптеці

Показники якості обслуговування	Сприйманий рівень обслуговування по групі, бали
Доступність товару в аптеці	8.1024
Професійні якості, переконливість персоналу	8.2384
Чуйність і співпереживання персоналу	8.2194
Внутрішнє облаштування аптеки для обслуговування споживача	8.2518
Додаткові умови обслуговування споживача та супутні послуги	6.9029
Інтегральний показник сприйманого споживачами рівня обслуговування	7.9472

Рисунок 3

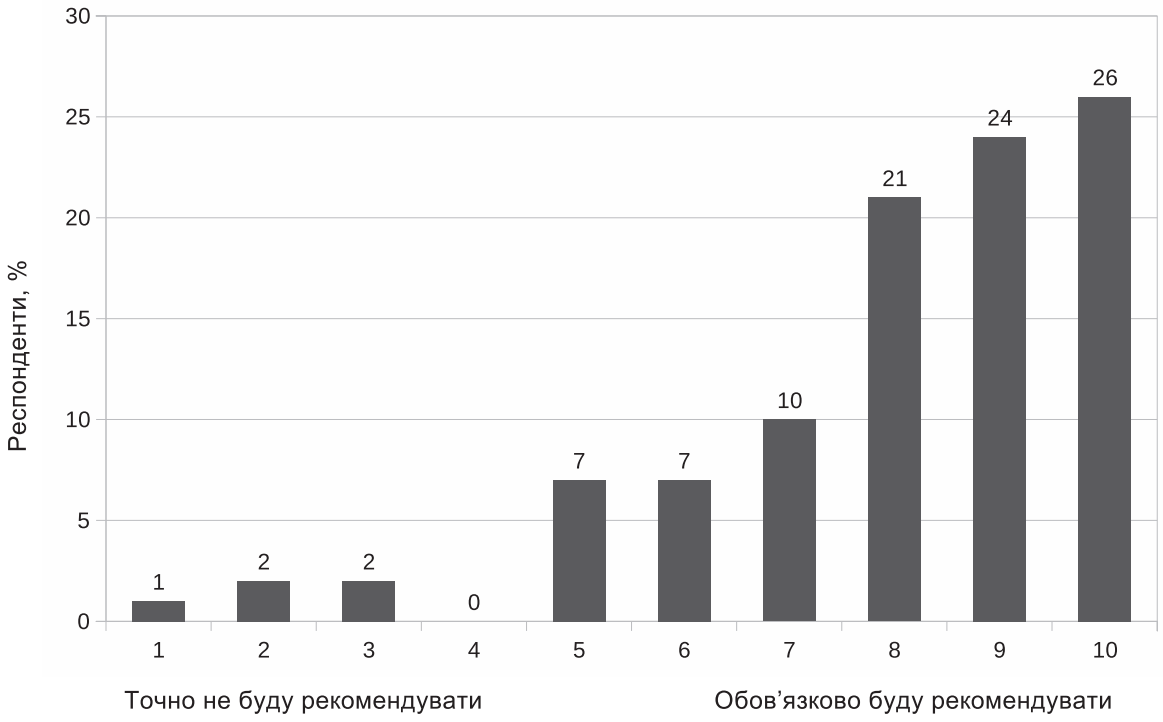


Ступінь задоволеності опитаних відвідувачів обслуговуванням в аптеці

тобто він є досить високим (за 10-бальною шкалою ідеальний ступінь задоволеності клієнтів дорівнює 10).

Аналіз лояльності відвідувачів аптеки за компонентою намірів показав, що переважна більшість опитаних (95 %) мають намір і у подальшому відвідувати досліджувану аптеку. Проте лише 26 % опитаних заявили, що не перейдуть до іншої аптеки у разі підвищення цін на препарати у досліджуваній аптеці. Для перевірки достовірності відповідей респондентів необхідно вводити до анкети питання-фільтри. Нами було поставлене запитання «Чи підете Ви до іншої аптеки, якщо потрібний Вам препарат бу-

Рисунок 4



Схильність респондентів до рекомендування досліджуваної аптеки своєму оточенню

де там дешевшим?». На це питання приблизно така сама частка опитаних (27 %) відповіли, що не підуть до іншої аптеки, якщо потрібний їм препарат буде там дешевшим. Отже, 26 % опитаних є не чутливими до привабливих дій з боку конкурентів досліджуваної аптеки і виявляють лояльне ставлення до цієї аптеки.

Іншим важливим показником, що характеризує лояльність клієнтів, є наміри рекомендувати підприємство. Дослідження показали, що половина опитаних (50 %) мають намір рекомендувати аптеку своїм друзям та знайомим (Рис. 4). Це ті респонденти, які оцінили свою готовність рекомендувати у 9-10 балів за 10-бальною шкалою. Вони належать до промоутерів.

Базуючись на даних опитування щодо готовності рекомендувати аптеку своєму оточенню, нами розраховано чистий індекс промоутерів NPS (індекс готовності рекомендувати), який набув широкого використання під час визначення лояльності клієнтів, за формулою [4, 10, 11]:

$$NPS = Ч_п - Ч_к, \quad (2)$$

де NPS — чистий індекс промоутерів, %;

$Ч_п$ — частка промоутерів серед клієнтів, %;

$Ч_к$ — частка критиків серед клієнтів, %.

Для визначення рівня лояльних клієнтів до аптечного закладу методом NPS необхідно орієнтуватись не на всіх опитуваних, а тільки на постійних клієнтів. Дослідження показали, що серед респондентів, які постійно відвідують цю аптеку, промоутери і критики становлять 25 % і 5 % від загальної кількості опитаних відповідно. У результаті NPS постійних клієнтів дорівнює 20 % від загальної кількості опитаних, тобто рівень лояльних клієнтів у досліджуваній аптеці за методом NPS становить 20 %.

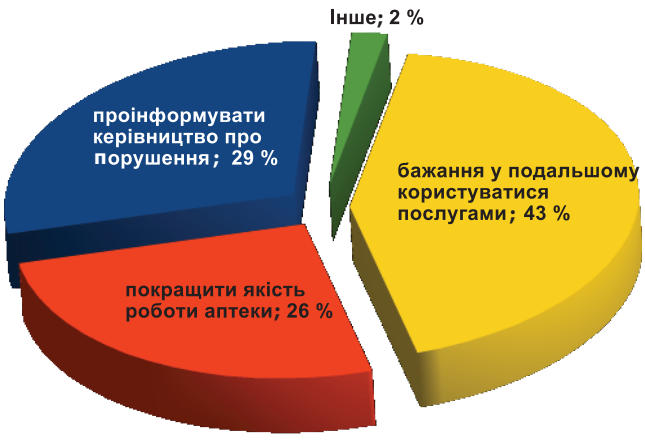
Іншим напрямом визначення лояльних клієнтів є аналіз скарг у Книзі скарг та пропозицій. Вважається, що ті клієнти, що оформлюють скарги в Книзі скарг та пропозицій, проявляють свою лояльність до підприємства, бо мають намір і у подальшому користуватися послугами аптеки з урахуванням своїх побажань. Проведені дослідження показали, що лише 36 % опитаних у випадку порушень зазвичай оформлюють скаргу в Книзі скарг та пропозицій. Серед цих респондентів (які зазвичай оформлюють скаргу в Книзі скарг та пропозицій) 43 % мотивують запис бажанням і у подальшому користуватися послугами аптеки, 29 % — необхідністю проінформувати керівництво про порушення, 26 % — прагненням покращити якість роботи, 2 % назвали інші причини (Рис. 5).

Частка респондентів, які зазвичай оформлюють скаргу та бажають і у подальшому користуватися послугами аптеки з урахуванням своїх побажань, становить 15.5 % від усіх опитаних. Зазначена частка клієнтів через свої наміри демонструє прихильність до досліджуваного аптечного закладу.

Отже, оцінка лояльності клієнтів за основними її компонентами дозволяє визначити частку постійних клієнтів, які здійснюють повторні покупки, є повністю задоволеними обслуговуванням, будуть рекомендувати аптеку своєму оточенню, мають наміри і в подальшому користуватися нею, а також виявити постійних клієнтів зі значною тривалістю користування послугами аптеки, з високою частотою відвідування, зі значною сумою чека.

Інтегральну оцінку лояльності клієнтів нами проведено відповідно до методики «Оцінка лояльності клієнтів до аптечного закладу на основі концепції Servqual» [14]. Інтегральна оцінка лояльності клієнтів за концепцією Servqual показує частку у відсотках кількості клієнтів, у яких сприйняття рівня обслуговування дорівнює або

Рисунок 5



Мотиви записів у Книзі скарг та пропозицій у респондентів, які зазвичай оформлюють скаргу

перевищує очікування ($S_{інт.j} \geq 0$), тобто вони є повністю задоволеними обслуговуванням. Дослідження показали, що доля лояльних клієнтів до досліджуваного закладу за концепцією Servqual становить 15.2 %.

Узагальнення результатів оцінки лояльності клієнтів до аптечного закладу за компонентами лояльності наведено у Табл. 2.

Порівнюючи узагальнений ступінь задоволеності клієнтів (8.1 балів) зі сприйманим споживачами рівнем обслуговування у аптеці (7.9 балів), бачимо, що значення цих показників досить близьке. Отримані результати свідчать про те, що сприйманому споживачами рівню обслуговування в аптеці відповідає ступінь їхньої задоволеності.

Клієнти, що завжди оформлюють скарги у Книзі скарг та пропозицій та бажають і у подальшому користуватися послугами аптеки з урахуванням своїх побажань, демонструють свою лояльність до досліджуваного аптечного закладу і становлять 15.5 % від усіх опитаних. Тобто інтегральна оцінка лояльності клієнтів, отримана за методикою на основі концепції Servqual (15.2 % опитаних), близька до оцінки за поведінковою компонентою лояльності і компонентою намірів на підставі аналізу скарг клієнтів (15.5 % опитаних). Використання методу маркетингового шкалювання для визначення повністю задоволених клієнтів показало, що як лояльні можуть розглядатися 23 % клієнтів, а оцінка лояльності клієнтів на підставі розрахунку чистого індексу промоутерів (NPS) дорівнює 20 %.

Висновки

1. Дослідження показали, що оцінка лояльності клієнтів за основними її компонентами з використанням різних методів дозволяє визначити частку постійних клієнтів, які здійснюють повторні покупки, є повністю задоволеними обслуговуванням, будуть рекомендувати аптеку своєму оточенню, мають наміри і в подальшому користуватися нею, тобто виявити лояльних до підприємства клієнтів.

2. Обґрунтовано, що сприйманому споживачами рівню обслуговування у аптеці (7.9 балів) відповідає ступінь їхньої задоволеності (8.1 балів) (за 10-бальною шкалою). Інтегральна оцінка лояльності клієнтів, що отримана за методикою на основі концепції Servqual (15.2 % опитаних), близька до оцінки за поведінковою компонентою лояльності і компонентою намірів на підставі аналізу скарг клієнтів (15.5 % опитаних). Визначено, що за компонентою ставлення як лояльні можуть розглядатися 23 % повністю задоволених клієнтів, а за компонентою намірів (на підставі розрахунку чистого індексу промоутерів (NPS)) — 20 %.

3. Використання різних методів оцінки лояльності клієнтів, які розглядають окремі її компоненти або їх сукупність (комплексні методи), показало, що визначений рівень лояльності характеризується незначним варіюванням — від 15.2 % до 23 %. Це свідчить про те, що розроблена методика та використані методи дослідження лояльності клієнтів є адекватними щодо оцінки її значення. Використання методів, що розглядають окремі компоненти лояльності, дає можливість оцінити її з різних позицій і визначити можливий діапазон.

Перспективи подальших розробок

Подальші дослідження спрямовані на сегментування клієнтів аптечного закладу за компонентами лояльності.

ЛІТЕРАТУРА
1. Братищенко А.С. Формирование лояльности потребителей как стратегическое направление маркетинга предприятия // Современные научные исследования и инновации. — 2015. — № 5 [Электронный ресурс]. URL: http://web.snauka.ru/issues/2015/05/53519.
2. Папазян Ж.В. Современные методы исследования лояльности клиентов // Современ. проблемы науки и образов. — 2013. — № 3. — С. 40-47.

Таблиця 2

Узагальнення результатів оцінки лояльності клієнтів до аптечного закладу за компонентами лояльності

Ставлення клієнтів до аптеки (за 10-бальною шкалою), бали		Інтегральна оцінка лояльності клієнтів за концепцією Servqual ($S_{інт.j} \geq 0$), %*	Компоненти лояльності		
			Поведінкова	Ставлення	Намірів
Інтегральний показник сприйняття рівня обслуговування за концепцією Servqual	Ступінь задоволеності клієнтів (метод шкалювання)		Постійні клієнти, %*		
			Оформлюють скарги і будуть користуватися аптекою	Повністю задоволені	Чистий індекс промоутерів (NPS)
7.9	8.1	15.2	15.5	23	20

* — процент від загальної кількості опитаних.

3. Півень О.П. Лояльність клієнта / О.П. Півень, І.В. Ткаченко // Фармацевтична енциклопедія / Голова ред. ради В.П. Черних. — 3 вид., переробл. і допов. — К.: Моріон, 2016. — С. 993-994.
4. Півень О.П. Лояльність клієнтів до підприємства: основні поняття і методи оцінки / О.П. Півень, І.В. Софронова, І.В. Ткаченко // Фармаком. — 2017. — № 1. — С. 51-57.
5. Колобова Е.П. Анализ методов оценки уровня лояльности потребителей // Известия Санкт-Петербургского университета экономики и финансов. — 2012.— № 3 (75). — С. 93-97.
6. Auh S. Compatibility effects in evaluations of satisfaction and loyalty / S. Auh, M. Johnson //Journal of Economic Psychology. — 2005. — Vol. 26. — Issue 1. — P. 35-57.
7. The American Customer Satisfaction Index. — Online Available at: http://www.theacsi.org/index.php.
8. Battista T. Complex sampling designs for the customer satisfaction index estimation / T. Battista, P. Valentini // Statistica. — 2007. — Vol. 67. — Issue 3. — P. 293-308.
9. Aijing X. How customer satisfaction affects loyalty: Insights from nonlinear hierarchical Bayes modeling of customer satisfaction index / X. Aijing, N. Terue, P.K. Kannan. — Online Available at: http://ir.library.tohoku.ac.jp/re/bitstream/10097/63822/1/tmarg124.pdf.
10. Keiningham T.L. Net Promoter, Recommendations, and Business Performance / T.L. Keiningham, L.K. Timothy, L. Aksoy, B. Cooil, T. Andreassen // Marketing Science, 2008. — Vol. 27. — Issue 3. — P. 531-532.
11. Літовкіна О.О. Маркетингова стратегія задоволення споживачів на основі індексу NPS (Net Promoter Score) // Маркетинг. — Економічний вісник. — 2013. — № 4. — С. 133-138.
12. Burböck B. Prospect Theory and Servqual // Management. — 2014. — Vol. 9. — Issue 2. — P. 155-168.
13. Півень О.П. Методика визначення лояльності клієнтів до аптечного закладу на основі комплексної оцінки якості обслуговування / О.П. Півень, І.В. Ткаченко, О.В. Шуванова // Управління, економіка і забезпечення якості фармації. — 2017. — № 4. — С. 67-75.
14. Півень О.П. Оцінка лояльності клієнтів до аптечного закладу на основі концепції Servqual: наук.-метод. реком. / О.П. Півень, І.В. Ткаченко, О.В. Шуванова. — К., 2017. — 28 с.
15. Півень О.П. Дослідження лояльності клієнтів аптечних закладів: наук.-метод. реком. / О.П. Півень, І.В. Ткаченко, О.В. Шуванова. — Харків: НФаУ, 2018. — 28 с.
16. Nobuhiko T. Hierarchical Modeling of the Customer Satisfaction Index / T. Nobuhiko, S. Hasegawa, T. Chun, K. Ogawa // Service Science. — 2011. — Vol. 3. — Issue 2. — P. 127-140.

УДК 615.12:339.187.2

Резюме

Пивень Е. П., Ткаченко И. В., Шуванова Е. В.
Национальный фармацевтический университет

Исследование клиентов аптечного учреждения по компонентам лояльности

Руководителям аптечных учреждений важно иметь совокупность инструментов, позволяющих проводить адекватную оценку лояльности своих клиентов и своевременно принимать меры по ее улучшению, при необходимости. Целью статьи является проведение оценки лояльности клиентов к аптечному учреждению по компонентам лояльности и интерпретация результатов исследования. Предложено проводить оценку лояльности клиентов к аптечному учреждению по таким компонентам лояльности, как поведение, отношение, намерение, а также комплексную оценку с использованием различных методов исследования. Обосновано, что по 10-балльной шкале воспринимаемому потребителями уровню обслуживания в аптеке (7.9 балла) соответствует степень их удовлетворенности (8.1 балла). Интегральная оценка лояльности клиентов, полученная по методике на основе концепции Servqual (15.2 % опрошенных), близка к оценке по поведенческой компоненте лояльности на основе анализа жалоб клиентов (15.5 % опрошенных). Определено, что по компоненте отношения в качестве лояльных могут рассматриваться 23 % полностью удовлетворенных клиентов, а по компоненте намерений (на основе расчета чистого индекса промоутеров (NPS)) — 20 %. Использование различных методов оценки лояльности клиентов, отражающих отдельные ее компоненты или их совокупность (комплексные методы), показало, что установленный уровень лояльности в исследуемой аптеке характеризуется относительно незначительным варьированием — от 15.2 % до 23 %. Это свидетельствует о том, что предложенная методология и использованные методы исследования являются адекватными для оценки лояльности клиентов.

Ключевые слова: лояльность покупателей, компоненты лояльности, поведенческая компонента, компонента отношений, компонента намерений, методы оценки лояльности, аптечное учреждение.

UDC 615.12:339.187.2

Summary

Piven O. P., Tkachenko I. V., Shuvanova O. V.
National University of Pharmacy, Ukraine

Investigation of customers of the pharmacy by loyalty components

It is important for heads of pharmacies to have a set of tools that allow them to conduct an adequate assessment of their customers' loyalty and take timely measures to improve it if necessary. The purpose of the article is to evaluate customers' loyalty to a pharmacy by loyalty components and to interpret the study results. We suggested assessing clients' loyalty to the pharmacy by the loyalty components such as behaviour, attitude, and intention as well as by complex assessment using different research methods. On a 10-point scale, the perceived level of customer service in the pharmacy (7.9 points) corresponded to the degree of their satisfaction (8.1 points). The integral evaluation of customers' loyalty, obtained by the method based on the Servqual concept (15.2 % of respondents), was close to the assessment on the behaviour component of loyalty based on the analysis of customers' complaints (15.5 % of respondents). It was determined that 23 % and 20 % of fully satisfied customers could be considered loyal by the attitude component and the intention component, respectively (based on the calculation of the net promoter score). The use of different methods of assessing customers' loyalty by either individual or total loyalty components showed that the established level of loyalty in the pharmacy under investigation was characterised by a relatively small variation, from 15.2 % to 23 %. This indicates that the methodology proposed and methods used are adequate to assess customers' loyalty.

Keywords: customer loyalty, loyalty components, behaviour component, attitude component, intention component, loyalty evaluation methods, pharmacy.

Півень Олена Петрівна. Закінчила Харківський інженерно-економічний інститут (1977). Д. фарм. н. (2005). Професор (2014). Професор кафедри фармацевтичного маркетингу та менеджменту НФаУ.

Ткаченко Ірина Валеріанівна. Здобувач кафедри фармацевтичного маркетингу та менеджменту НФаУ.

Шуванова Олена Володимирівна. Асистент кафедри фармацевтичного маркетингу та менеджменту НФаУ, к. фарм. н.