

## Валідація методики кількісного визначення субстанції преднізолону методом МПП

### Об'єкт дослідження

Субстанція преднізолону, яка відповідає вимогам Фармакопеї. Для нівелювання впливу чистоти субстанції валідаційні дослідження проводили з використанням ФСЗ преднізолону, Сертифікат № 11/1-2143 з атестованим значенням 99.8 %. Відповідно до Сертифікату, цей ФСЗ призначений для кількісного визначення методом однохвильової СФ з  $\max \Delta_{As} \geq 1.6 \%$ , тобто цілком підходить для кількісного визначення субстанції преднізолону ( $\max \Delta_{As} = 3.0 \%$ ).

### Завдання

Валідувати методику кількісного визначення преднізолону в субстанції преднізолону у варіанті методу показника поглинання (МПП).

Допуски вмісту преднізолону в субстанції за специфікацією 97.0-103.0 %, тобто  $B = 3.0 \%$ .

### Методика аналізу, що валідується

0.100 г субстанції розчиняють у 96% спирті  $P$  і доводять об'єм розчину цим самим розчинником до 100.0 мл. 2.0 мл одержаного розчину доводять 96% спиртом  $P$  до об'єму 100.0 мл. Вимірюють оптичну густину одержаного розчину в максимумі за довжини хвилі 243.5 нм.

Розраховують вміст  $C_{21}H_{28}O_5$ , використовуючи питомий показник поглинання 415.

Номінальне значення оптичної густини  $A_{nom} = 415 \times 0.1 \times 2 / 100 = 0.830$ . Це значення відповідає вимогам (7.14) розділу 7 до оптимального значення оптичної густини.

### П.4.1. Кваліфікація обладнання

#### П.4.1.1. Кювети

Оцінку кюветної різниці для пари стандартних кювет (А:В) проводили, вимірюючи оптичну густину компенсаційного розчину (згідно з методикою — 96% спирт  $P$ ) з подальшим поворотом кювет на  $180^\circ$  і повторним вимірюванням. Різниця середніх значень трьох вимірювань оптичних густин компенсаційного розчину у вихідній кюветі і повернутій на  $180^\circ$  склала  $\Delta A = A_{cp.1} - A_{cp.2} = 0.0949 - 0.0933 = 0.0016$ , тобто відповідає вимозі:

$$\Delta A \leq 0.002. \quad (\text{П.4.1})$$

### П.4.1.2. Правильність оптичної густини

Перед початком експерименту проводили контроль правильності оптичної густини для цього спектрофотометра (SPECORD-200) за фармакопейним розчином калію дихромату  $P$  в  $0.005 M$  кислоті сірчаній ( $m_n = 0.060$  г) відповідно до методики загальної статті «Абсорбційна спектрофотометрія в ультрафіолетовій і видимій областях» (2.2.25). Одержані результати наведені в Табл. П.4.1.

Таблиця П.4.1

#### Перевірка правильності оптичної густини

| Довжина хвилі $\lambda$ , нм | Оптична густина |           | Питомий показник поглинання |                    | Відхилення оптичної густини |              |                |                                       | Невизначеність показника поглинання, % |                 |
|------------------------------|-----------------|-----------|-----------------------------|--------------------|-----------------------------|--------------|----------------|---------------------------------------|--|-----------------|
|                              |                 |           |                             |                    | абсолютне                   |              | відносне       |                                       |  |                 |
|                              | $A^*$           | $A_{nom}$ | $A_{1cm}^{1\%}$             | $nomA_{1cm}^{1\%}$ | $\Delta A$                  | $\Delta A_0$ | $\Delta A, \%$ | $\frac{\Delta A}{A_{nom}} \times 100$ | $\delta_A$                             | $\max \delta_A$ |
| 235                          | 0.7493          | 0.747     | 124.88                      | 124.5              | 0.0023                      | 0.01         | 0.31           | 1.34                                  | 0.31                                   | 1.9             |
| 257                          | 0.8662          | 0.867     | 144.37                      | 144.5              | 0.0008                      | 0.01         | 0.09           | 1.15                                  | 0.09                                   | 1.6             |
| 313                          | 0.2918          | 0.292     | 48.63                       | 48.6               | 0.0002                      | 0.01         | 0.07           | 3.43                                  | 0.07                                   | 4.8             |
| 350                          | 0.6461          | 0.646     | 107.68                      | 107.3              | 0.0001                      | 0.01         | 0.02           | 1.55                                  | 0.36                                   | 2.2             |
| 430                          | 0.9285          | 0.954     | 15.90                       | 15.9               | 0.0255                      | 0.01         | 2.67           | 1.05                                  | 0.01                                   | 1.5             |

\* Середнє з трьох вимірювань значення оптичної густини

Як видно з Табл. П.4.1, правильність оптичної густини відповідає вимогам Табл. 7.1 розділу 7.

### П.4.1.3. Збіжність оптичної густини з вийманням кювет

Оцінювання кваліфікації спектрофотометра проводили, отримуючи тридцять значень оптичної густини випробовуваного розчину субстанції преднізолону проти компенсаційного розчину з рандомізацією положення кювет. Розраховане на основі експериментальних даних ( $A_{cp} = 0.8240$ ,  $SD = 0.0021$ ) відносне стандартне відхилення оптичної густини  $RSD = 0.25 \%$  відповідає рекомендаціям:

$$S_{Ac,r} = 0.25 \leq 0.25 \%. \quad (\text{П.4.2})$$

### П.4.1.4. Граничний рівень розсіяного світла

Розсіяне світло обмежує ту граничну оптичну густину, яка може бути досягнута на цьому спектрофотометрі за цієї довжини хвилі. Рівень розсіяного світла загалом є обернено пропорційним четвертому ступеню довжини хвилі, тому

контроль рівня розсіяного світла є актуальним для ультрафіолетової області.

Визначення рівня розсіяного світла проводили відповідно до вимог загальної статті 2.2.25 Фармакопеї за заданих довжин хвиль із використанням відповідних розчинів. Середня оптична густина трьох вимірювань аналізованого розчину (12 г/л *калію хлориду Р*) у кюветі з товщиною шару 1 см різко зростала в діапазоні довжин хвиль 220 нм і 200 нм і за 198 нм у разі використання *води Р* як компенсаційного розчину і склала  $A_{cp} = 2.554$ . Отриманий результат відповідає вимогам Фармакопеї ( $2.554 > 2.0$ ).

#### П.4.1.4. Вимоги до розчинників

Під час кількісного визначення преднізолону як розчинник використовується 96% *спирт Р*. Оптична густина розчинника, вимірювана проти повітря за аналітичної довжини хвилі  $\lambda = 243.5$  нм, дорівнює  $0.1665 \leq 0.2$ , тобто відповідає вимогам статті 2.2.25 Фармакопеї.

### П.4.2. Валідація методики кількісного визначення субстанції преднізолону

#### П.4.2.1. Вимоги до повної граничної невизначеності результатів аналізу ( $\max \Delta_{As}$ )

Відповідно до співвідношення (7.2) і допусків 97.0-103.0 ( $B = 3.0\%$ ), для преднізолону  $\max \Delta_{As} = 3.0\%$ .

#### П.4.2.2. Прогноз невизначеності пробопідготовки ( $\Delta_{SP}$ )

Прогноз невизначеності пробопідготовки  $\Delta_{SP}$  (див. п. 4.5 розділу 4) наведений у Табл. П.4.2.

Таблиця П.4.2

Прогноз невизначеності пробопідготовки методики кількісного визначення субстанції преднізолону

| Операція пробопідготовки                  | Параметр розрахункової формули | Невизначеність, %                                    |
|---|--------------------------------|--|
| <i>Випробовуваний розчин</i>              |                                |  |
| Взяття наважки                            | $m_0$                          | $0.2 \text{ мг} / 100 \text{ мг} \times 100 = 0.2\%$ |
| Доведення до об'єму в мірній колбі 100 мл | 100                            | 0.12 %   |
| Взяття аліквоти піпеткою 2.0 мл           | 2                              | 0.5 %  |



|  |        |        |        |        |        |       |        |      |             |             |
|--|--------|--------|--------|--------|--------|-------|--------|------|-------------|-------------|
| $A_i$  | 0.8152 | 0.8209 | 0.8230 | 0.8216 | 0.8218 | 99.78 | 0.2558 | 0.26 | <b>0.55</b> | <b>0.96</b> |
|  | 0.8191 | 0.8166 | 0.8212 | 0.8223 | 0.8215 |       |        |      |             |             |
|  | 0.8171 | 0.8202 | 0.8170 | 0.8230 | 0.8224 |       |        |      |             |             |
| $A_{сеп.}$   | 0.8171 | 0.8192 | 0.8204 | 0.8223 | 0.8219 |       |        |      |             |             |
| $Y_i = 100 \times A_t / A_{ном.},$<br>% ( $A_{ном.} = 0.822$ нм) | 99.41  | 99.66  | 99.81  | 100.04 | 99.99  |       |        |      |             |             |

Стабільність оптичної густини випробовуваного розчину протягом 1 год характеризується довірчим інтервалом  $\pm 0.55$  % і є незначущою порівнюючи з максимально допустимою повною невизначеністю методики аналізу  $max \Delta_{As}$  ( $0.55 \leq 0.96$ ).

Дослідження впливу незначних коливань рН на оптичну густину випробовуваного розчину проводили, прибавляючи по 1 краплі  $0.01$  М розчину кислоти хлористоводневої або  $0.01$  М розчину натрію гідроксиду, щоб відтворити коливання рН  $\pm 10$  %. Для отримання модельних розчинів вимірювали оптичну густину за  $243.5$  нм. Результати дослідження впливу коливань рН на результати аналізу наведені в Табл. П.4.4.

Таблиця П.4.4

Результати дослідження впливу рН середовища на оптичну густину модельних розчинів

| Випробовуваний розчин  | Оптична густина $A_t^*$ ( $\lambda = 243.5$ нм) |                       |                                     | $C_{r, pH}$ | $S_{r, pH}$ | $RSD_{pH},$<br>% | $\Delta pH,$<br>% | $0.32^{*} max \Delta_{As},$<br>% |
|--|---|-----------------------|-------------------------------------|-------------|-------------|------------------|-------------------|----------------------------------|
|  | розчин 1:<br>+ X кр.<br>0.01 М НСІ              | розчин 2: без<br>змін | розчин 3:<br>+ X кр. 0.01 М<br>NaOH |             |             |                  |                   |                                  |
| <b>Випробовуваний розчин + 1 крапля реактиву</b>                   |   |                       |                                     |             |             |                  |                   |                                  |
| 1  | 0.8165  | 0.8152                | 0.8176                              | 99.59       | 0.11        | 0.11             | 0.33              | 0.96                             |
| 2  | 0.8179  | 0.8191                | 0.8204                              |             |             |                  |                   |                                  |
| 3  | 0.8191  | 0.8216                | 0.8210                              |             |             |                  |                   |                                  |
| $A_{сеп.}$   | 0.8178  | 0.8186                | 0.8197                              |             |             |                  |                   |                                  |
| $Y_i = 100 \times A_t /$<br>$A_{ном.},$ % ( $A_{ном.} =$<br>0.822) | 99.49   | 99.59                 | 99.72                               |             |             |                  |                   |                                  |
| <b>Випробовуваний розчин + 2 краплі реактиву</b>                   |   |                       |                                     |             |             |                  |                   |                                  |
| 1  | 0.8166  | 0.8152                | 0.8194                              | 99.74       | 0.21        | 0.21             | 0.62              | 0.96                             |
| 2  | 0.8197  | 0.8191                | 0.8226                              |             |             |                  |                   |                                  |
| 3  | 0.8209  | 0.8216                | 0.8235                              |             |             |                  |                   |                                  |
| $A_{сеп.}$   | 0.8191  | 0.8186                | 0.8218                              |             |             |                  |                   |                                  |
| $Y_i = 100 \times A_t /$<br>$A_{ном.},$ % ( $A_{ном.} =$<br>0.822) | 99.64   | 99.59                 | 99.98                               |             |             |                  |                   |                                  |
| <b>Випробовуваний розчин + 3 краплі реактиву</b>                   |   |                       |                                     |             |             |                  |                   |                                  |
| 1  | 0.8187  | 0.8152                | 0.8205                              | 99.96       | 0.33        | 0.33             | 0.96              | 0.96                             |
| 2  | 0.8232  | 0.8191                | 0.8246                              |             |             |                  |                   |                                  |

|  |        |        |        |  |  |  |  |  |
|--|--------|--------|--------|--|--|--|--|--|
| 3  | 0.8258 | 0.8216 | 0.8263 |  |  |  |  |  |
| $A_{сер.}$   | 0.8226 | 0.8186 | 0.8238 |  |  |  |  |  |
| $Y_i = 100 \times A_t / A_{ном.}, \% (A_{ном.} = 0.822)$ | 100.07 | 99.59  | 100.22 |  |  |  |  |  |

\* Середнє значення оптичної густини трьох вимірювань.

Дослідження робастності методики кількісного визначення преднізолону показало, що коливання рН кінцевих розчинів у діапазоні  $\pm 10\%$  значуще не впливає на відтворюваність величини оптичної густини:  $\Delta_{рН} = 0.96 \leq 0.96$ .

#### П.4.2.6. Лінійність

Лінійність для досліджуваної методики вивчали для 9 концентрацій модельних розчинів, які охоплювали діапазон від 80 % до 120 % від номінального вмісту в субстанції. Розрахунки проводили в системі нормалізованих координат. За всіма 9 розчинами була обрахована методом найменших квадратів лінійна залежність відношення оптичних густин  $Y_i = (A_i / A_{ном.}) \times 100$  від відношення концентрацій  $X_i = (C_i / C_{ном.}) \times 100$ , тобто залежність:

$$Y_i = b \times X_i + a.$$

Одержані рівняння лінійної залежності для преднізолону мають вигляд:

$$1\text{-й день: } Y_i = 0.9655 \times X_i + 1.3.$$

$$2\text{-й день: } Y_i = 0.9877 \times X_i + 1.2.$$

Метрологічні характеристики цих рівнянь подані в Табл. П.4.5. Критерії — Табл. 7.2 розділу 7.

Таблиця П.4.5

Метрологічні характеристики лінійної залежності для преднізолону в різні дні.  
Діапазон 80-120 %, число точок 9

| Величини | Значення |          | Критерії (для допусків 97-103 %)   | Висновок (відповідає чи ні)   |
|----------|----------|----------|--|-------------------------------|
|          | 1-й день | 2-й день |  |                               |
| $b$      | 0.9654   | 0.9877   | —  | —                             |
| $s_b$    | 0.0067   | 0.0012   | —  | —                             |
| $a$      | 1.3      | 1.2      | 1) статист. незначущість<br>$\leq 1.89 \times s_a = 1.3$ ;<br>$\leq 1.89 \times s_a = 2.3$ ;<br>2) прийнятне значення<br>$a \leq 4.39$ | відпов.<br>відпов.<br>відпов. |
| $s_a$    | 0.67     | 1.2      | —  | —                             |

|         |        |        |               |         |
|---------|--------|--------|---------------|---------|
| $RSD_o$ | 0.26   | 0.45   | $\leq 1.1$    | ВІДПОВ. |
| $r^2$   | 0.9998 | 0.9991 | $\geq 0.9933$ | ВІДПОВ. |

Приклад графічного представлення даних — див. Рис. П.4.1.

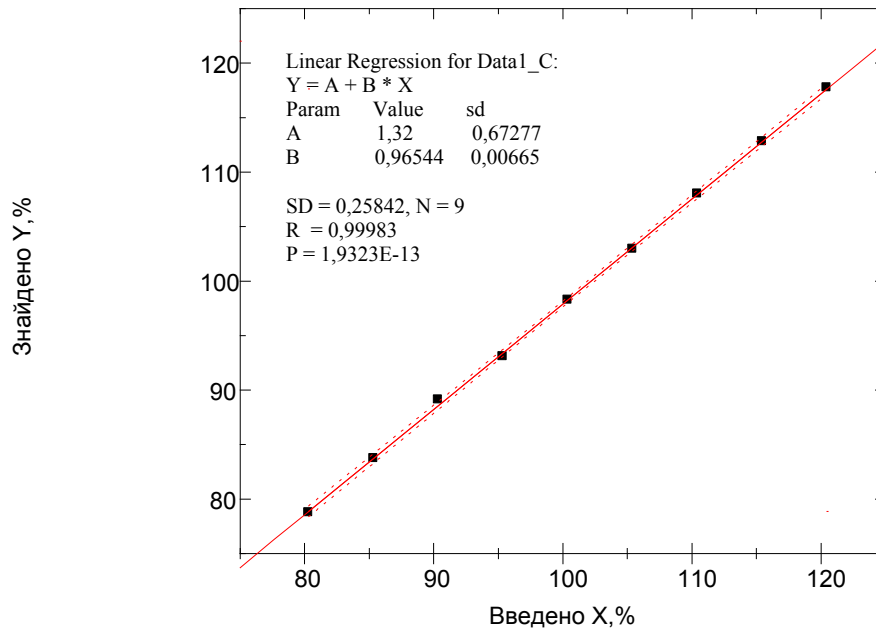


Рисунок П.4.1. Графік залежності оптичної густини від концентрації преднізолону в нормалізованих координатах. 1-й день

Як видно, вимоги до лінійності для методики кількісного визначення субстанції преднізолону витримуються в два різних дні.

#### П.4.2.7. Правильність і прецизійність

Прецизійність і правильність методики оцінювали з даних із лінійності, одержаних у результаті аналізу того самого зразка в різні дні в тій самій лабораторії на тому самому приладі. Результати розрахунків прецизійності і правильності надані в Табл. П.4.6. Критерії — Табл. 7.2 розділу 7.

Таблиця П.4.6

Результати аналізу модельних сумішей у різні дні і їх статистична обробка

| № розчину | Введено в % до концентрації розчину порівняння<br>$X_i = (C_i / C_{nom.}) \times 100 \%$ | Знайдено в % до концентрації розчину порівняння<br>$Y_i = (A_i^* / A_{nom.}) \times 100 \%$ | Знайдено в % до введеного<br>$Z = (Y_i / X_i) \times 100 \%$ |
|-----------|--|---|--|
|-----------|--|---|--|

|  | День 1 | День 2 | День 1 | День 2 | День 1          | День 2       |
|--|--------|--------|--------|--------|-----------------|--------------|
| 1  | 80.32  | 80.16  | 78.75  | 80.31  | 98.04           | 100.18       |
| 2  | 85.34  | 85.17  | 83.69  | 85.63  | 98.06           | 100.54       |
| 3  | 90.36  | 90.18  | 89.10  | 89.99  | 98.61           | 99.79        |
| 4  | 95.38  | 95.19  | 93.05  | 95.14  | 97.55           | 99.95        |
| 5  | 100.40 | 100.20 | 98.24  | 100.80 | 97.85           | 100.60       |
| 6  | 105.42 | 105.21 | 102.94 | 104.93 | 97.65           | 99.74        |
| 7  | 110.44 | 110.22 | 107.99 | 109.61 | 97.78           | 99.44        |
| 8  | 115.46 | 115.23 | 112.77 | 115.73 | 97.67           | 100.43       |
| 9  | 120.48 | 120.24 | 117.72 | 119.70 | 97.71           | 99.55        |
| Середнє, $X$ , %   |        |        |        |        | <b>97.9</b>     | <b>100.0</b> |
| Відносне стандартне відхилення, $RSD_x$ , %  |        |        |        |        | 0.32            | 0.43         |
| Відносний довірчий інтервал<br>$\Delta_{prec}, \% = t(95\%, 8) \times RSD_x = 1.86 \times RSD_x$   |        |        |        |        | <b>0.60</b>     | <b>0.80</b>  |
| Критичне значення збіжності результатів $\Delta_{prec} \leq 2.1\%$   |        |        |        |        | відп.           | відп.        |
| Систематична похибка $\delta =  X - 100 $  |        |        |        |        | <b>2.1</b>      | <b>0.0</b>   |
| Критерій прийнятності систематичної похибки<br>(1) $\delta \leq \Delta_{prec} / 3 = 0.60 / 3 = 0.20$ ;<br>$\delta \leq \Delta_{prec} / 3 = 0.80 / 3 = 0.27$<br>якщо не виконується (1), то (2) $\delta \leq \max \delta_{tot} = 2.1$ |        |        |        |        | не відп.        | відп.        |
| Висновок про методику в кожний день  |        |        |        |        | коректн<br>а    | коректна     |
| <b>Внутрішньолабораторна прецизійність</b>   |        |        |        |        |                 |              |
| Об'єднане середнє, $Z_{intra}$ , % =   |        |        |        |        | <b>99.0</b>     |              |
| Об'єднане стандартне відхилення, $SD_{z-intra}$ , % =  |        |        |        |        | <b>1.2</b>      |              |
| Відносний довірчий інтервал<br>$\Delta_{intra}, \% = t(95\%, 17) \times SD_{z-intra}, \% = 1.74 \times SD_{z-intra}, \%$   |        |        |        |        | <b>2.0</b>      |              |
| Критичне значення збіжності результатів $\Delta_{intra} \leq 2.1\%$  |        |        |        |        | відп.           |              |
| Внутрішньолабораторна систематична похибка $\delta =$  |        |        |        |        | <b>1.0</b>      |              |
| Критерій прийнятності систематичної похибки<br>(1) $\delta \leq \Delta_{intra} / \sqrt{18} = 1.2 / 4.2 = 0.27\%$<br>Якщо не виконується (1), то (2) $\delta \leq \max \delta_{tot} = 2.1\%$  |        |        |        |        | не відповідає   | відповідає   |
| <b>Внутрішньолабораторна прецизійність методики</b>  |        |        |        |        | <b>коректна</b> |              |
| <b>Загальний висновок про методику</b>   |        |        |        |        | <b>коректна</b> |              |



\* Середнє значення оптичної густини трьох вимірювань

#### *П.4.2.8. Внутрішньолабораторна прецизійність*

Розрахунки проведені за співвідношенням (7.36). Результати наведені в Табл. П.4.6. Як видно, вимоги внутрішньолабораторної прецизійності виконуються. Коректна загалом і вся методика.

Підсумовуючи дослідження з валідації методики кількісного СФ-визначення преднізолону за допомогою МПП, можна зробити висновок, що використання МПП для аналізу субстанцій вимагає ретельного проведення аналізу й урахування дуже багатьох факторів, серед яких на перше місце виходить кваліфікація спектрофотометра. Використанню МПП для аналізу субстанцій сприяє обов'язковість GMP на підприємствах. Завдяки цьому аналіз субстанцій проводиться практично повністю на підприємствах, що значно зменшує невизначеність градування.