

В. РЕКОМЕНДАЦІЇ ТЕХНІЧНОГО КЕРІВНИЦТВА ЄВРОПЕЙСЬКОЇ ФАРМАКОПЕЇ

3. ВАЛІДАЦІЯ АНАЛІТИЧНИХ МЕТОДИК¹

В описаних нижче розділах обговорюється низка моментів, які є важливими для валідації методів, які використовують специфічну аналітичну техніку. Ці керівництва мають використовуватися разом із загальними методами Фармакопеї і вимогами до валідації, наведеними вище в документах ІСН.

3.1. Оптичне обертання (2.2.7)

3.1.1. Вступ

Обирають розчинник, який дозволяє одержувати максимально можливий кут обертання. Досліджують стабільність кута обертання випробовуваного розчину протягом не менше 2 год. Якщо необхідно, зазначають, що розчин використовують свіжоприготованим. У необхідних випадках зазначають час досягнення стабільного значення кута обертання. Там, де можливо, використовують D-лінію натрію.

3.1.2. Ідентифікація

Якщо випробовувана речовина являє собою енантіомер, то для ідентифікації використовують питомий показник оптичного обертання.

Якщо питомий показник оптичного обертання використовують лише для ідентифікації, то його значення можна не перераховувати на суху речовину. Регламентовані межі величини питомого показника мають враховувати допустимі межі кількісного вмісту аналізованої речовини і чистоту зразків різного походження, які витримують вимоги відповідної монографії.

Якщо питомий показник оптичного обертання використовується також і для контролю чистоти енантіомерів, то випробування розділу «Ідентифікація» може містити посилання: «Витримує вимоги випробування на питоми оптичне обертання».

3.1.3. Випробування

Питомий показник оптичного може бути використаний для підтвердження оптичної чистоти енантіомеру. Цей метод менш чутливий за метод хіральної рідинної хроматографії. У разі коли вимірювання питомого оптичного обертання призначене для того, щоб нормувати вміст одного з енантіомерів, необхідно показати, що в умовах методики аналізований енантіомер має

¹ Технічне керівництво з розробки монографій (Technical Guide for the Elaboration of monographs. 7th Edition. — European Pharmacopoeia, European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare. — 2015. — 74 p.).

достатню величину оптичного обертання, щоб бути виявленим. Результат визначення подають у перерахунку на суху речовину або на речовину, вільну від розчинника. Там, де це можливо, подають дані про вплив потенційних домішок. Межі питомого показника оптичного обертання встановлюють із урахуванням можливого вмісту домішок. За відсутності інформації про оптичне обертання домішок зазвичай встановлюють межі відхилення $\pm 5\%$ від середнього значення, одержаного на зразках, що відповідають усім іншим вимогам окремої монографії. Там, де це можливо, досліджують зразки різного походження. Корисно також дослідити зразки з термінами придатності, близькими до граничного, щоб дослідити вплив процесу старіння в нормальних умовах зберігання.

Вимірювання оптичного обертання може використовуватися для підтвердження того, що субстанція є рацематом. У таких випадках зазвичай установлюють межі від -0.10° до $+0.10^\circ$.

Якщо можливо, має бути продемонстровано, що в умовах випробування енантіомер має оптичну активність, яка дозволяє коректно його визначити.

У деяких випадках кут обертання може бути використаний для підтвердження оптичної чистоти енантіомеру. Наприклад, у разі додавання до метилдопи AlCl_3 кут обертання збільшується за рахунок утворення комплексу.

3.2. Ультрафіолетова спектрофотометрія (2.2.25)

У всіх випадках має бути показана придатність обраних умов визначення, таких як використовувані розчинники та їх якість, рН розчину тощо. Зазвичай ультрафіолетова спектрофотометрія має обмежену специфічність, яку можна підвищити використанням першої і другої похідної спектра.

3.2.1. Ідентифікація

Ультрафіолетова спектрофотометрія окремо рідко використовується для ідентифікації. Коли цей метод включають у набір випробувань для ідентифікації, вивчають його специфічність шляхом порівняння спектрів аналізованої речовини зі спектрами подібних сполук. Специфічність методу можна підвищити, якщо використовувати не абсолютні значення оптичних густин, а спектральні відношення.

3.2.2. Випробування на граничний вміст домішок

Якщо ультрафіолетова спектрофотометрія використовується у випробуваннях на граничний вміст домішок, треба показати, що аналізовані домішки дають достатній внесок у вимірювану оптичну густину. За вибраної довжини хвилі має бути встановлена оптична густина, відповідна нормованій концентрації аналізованої домішки.

3.2.3. Кількісне визначення

Якщо ультрафіолетова спектрофотометрія використовується для кількісного визначення, то треба оцінити вплив домішок на світлопоглинання. Під час кількісного визначення не рекомендується використовувати питомий показник поглинання. Якщо питомий показник поглинання все ж застосовується, то його значення треба встановлювати на підставі міжлабораторного дослідження, використовуючи серії із відомою чистотою. Чистота цих зразків має оцінюватися з використанням різних методів, які включають як методи розділення, так і абсолютні методи (які не вимагають використання стандартного зразка).

3.3. Неінструментальні граничні випробування

3.3.1. Зовнішній вигляд розчину (2.2.1 і 2.2.2)

Це прості візуальні випробування, призначені для оцінювання загальної чистоти субстанції і засновані на порівнянні забарвлення (або опалесценції) випробовуваного розчину і серії еталонів. Зазвичай випробовуваний розчин має бути прозорим та безбарвним. Ці тести призначені для оцінювання чистоти речовини на базі загального критерію чистоти.

Часто невідомо, які домішки і в якій концентрації зумовлюють забарвлення або опалесценцію. У цьому разі валідація ґрунтується на зіставленні даних, одержаних для різних серій, поданих виробником (або виробниками). Якщо домішки відомі і доступні, валідацію цього методу проводять шляхом порівняння з більш досконалим методом.

3.3.2. Кислотність і лужність

Це неспецифічне випробування є однією з характеристик загальної чистоти препарату і використовується для контролю протеолітичних домішок. Його підходяще використання описано вище.

3.3.3. Випробування на допустимі межі вмісту аніонів і катіонів (2.4)

Це швидкі і прості випробування, але їх придатність треба довести шляхом використання методу добавок і/або порівняння з іншими, більш досконалими методами.

Сульфатна зола (2.4.14). Це випробування призначене для визначення суми катіонів металів, присутніх в органічних субстанціях, але не придатне для неорганічних солей органічних сполук. Зазвичай межа не має перевищувати 0.1 %. Цей гравіметричний тест контролює вміст сторонніх катіонів на рівні, який є достатнім для доказу якості виробництва. Цей метод вважається добре обґрунтованим і не потребує валідації.

Кольорові реакції або реакції осадження. Для окремих катіонів і аніонів описані граничні випробування, засновані на візуальному порівнянні забарвлення або опалесценції. Водночас необхідно довести, що:

- забарвлення або опалесценція для нормованих концентрацій виразно видні;
- знайдена концентрація доданого іона однакова як для випробовуваного розчину, так і для розчину порівняння (як візуально, так і за допомогою методів, заснованих на вимірюванні поглинання);
- значення оптичної густини розчинів, що містять 50 %, 100 % і 150 % аналізованої домішки від нормованої концентрації, мають значуще відрізнятись;
- визначення домішки на рівні нормованої концентрації проводять не менше шести разів і обчислюють стандартне відхилення. Знайдена концентрація має становити не менше 80 % від введеної, а відносне стандартне відхилення — не більше 20 %.

Доцільно провести порівняння результатів граничного випробування з результатами кількісного визначення з використанням незалежного методу, наприклад атомно-абсорбційної спектрофотометрії для катіонів або іонної хроматографії для аніонів.

Результати, одержані двома методами, мають бути близькими.

3.4. Атомно-абсорбційна спектрометрія (2.2.23)

Метод атомно-абсорбційної спектрометрії (ААС) застосовують для випробувань з визначення вмісту окремих елементів, присутніх у зразку. Описані нижче валідаційні вимоги застосовні, зокрема, до атомно-абсорбційних методик. Більш повно валідаційні вимоги наведені в загальній статті.

3.4.1. Специфічність

Специфічність цього методу визначається тим, що атоми аналізованого елемента поглинають характеристичне випромінювання від джерела зі строго дискретними довжинами хвиль, відповідними цьому елементу. Однак можливі перешкоди внаслідок як оптичних, так і хімічних ефектів. Перед початком валідації необхідно виявити такі перешкоди і, якщо можливо, зменшити їх вплив шляхом використання відповідних засобів.

Ці перешкоди можуть призвести до систематичної похибки під час використання методу прямого калібрування або до зміни чутливості методу. Основним джерелом похибки в методі ААС є похибки, пов'язані з процесом калібрування і заважальним впливом матриці (необхідно остерігатися «ефекту пам'яті»).

3.4.2. Калібрування

Готують водні розчини порівняння з різними концентраціями в межах діапазону застосування методики.

Потрібне число концентрацій визначається використовуваною моделлю для калібрування. Для підтвердження придатності лінійної моделі потрібно не менш ніж 4 різних концентрації. Параболічна модель також потребує використання не менш ніж 4 концентрацій. Бажано, щоб концентрації були рівномірно розташовані в межах діапазону методики.

Рекомендується використовувати концентрації калібрувальних розчинів із рівномірним розподілом усередині діапазону застосування.

Для кожної концентрації рекомендується виконувати не менше 5 вимірювань.

Проблеми з калібруванням часто можуть виявлятися візуально. Однак калібрувальні графіки самі окремо не можна використовувати як доказ придатності методу калібрування.

Калібрувальний графік подають так:

- На графіку відкладають виміряні оптичні густини як функції концентрацій і будують криву, що описує цю калібрувальну функцію, разом із її довірчими інтервалами. Калібрувальна функція має відповідати експериментальним даним.
- На графіку відкладають залишкові відхилення (різниці між виміряними і обчисленими за калібрувальним графіком оптичними густинами) як функції концентрації. Ці різниці мають розподілятися навколо осі абсцис випадково.

Для атомної спектрометрії розкид значень сигналу часто зростає зі зростанням концентрації, що може бути виявлено з графіка залишкових відхилень або з використанням однобічного критерію Стюдента. У цьому разі найкраща прецизійність може бути досягнута використанням калібрування з ваговими множниками.

Може бути застосована як лінійна, так і квадратична вагова функція.

У разі використання вагової моделі будується графік зважених різниць (тобто різниць, помножених на ваги) як функції концентрації у такий спосіб.

- На графіку відкладають виміряні оптичні густини як зважені функції концентрацій і будують криву, що описує цю калібрувальну функцію разом із її довірчими інтервалами.
- На графіку відкладають зважені залишкові відхилення як функції концентрації.

Необхідно показати, що модель достатньо точно описує експериментальні дані. Використання лінійної моделі калібрування передбачає вивчення для неї лінійності.

3.4.3. Ефекти матриці

Якщо для одержання калібрувальної функції використовують водні розчини, то необхідно показати, що чутливість для розчину аналізованого зразка і калібрувальних розчинів однакова. Якщо застосовується калібрування як пряма лінія, відмінності в чутливості можуть бути виявлені шляхом порівняння нахилів калібрувальної прямої, одержаної із використанням еталонних розчинів, і розчинів, одержаних внесенням стандартної добавки до випробовуваного розчину. Прецизійність оцінки нахилів обох прямих залежить від числа і розподілу точок вимірювання. Тому для побудови обох регресій цих ліній рекомендується використовувати достатнє число точок (не менше п'яти для обох прямих) і обирати концентрації переважно на межах діапазону калібрування.

Обґрунтуванням для можливості використання методу калібрувальної кривої є незначущість розходжень нахилів одержаних прямих за критерієм Стьюдента. Якщо розходження істотні, то використовують метод стандартних добавок.

3.4.4. Межа виявлення і межа кількісного визначення (метод, який ґрунтується на стандартному відхиленні сигналу контрольного дослідження)

Для оцінки меж виявлення і кількісного визначення готують і аналізують репрезентативну кількість контрольних дослідів. Краще використовувати розчини плацебо, що містять усі компоненти зразка, за винятком визначуваного. Якщо такі контрольні дослідження виконати неможливо, допустимо використовувати холості розчини, що містять усі реагенти і приготовані так само, як і випробовуваний розчин.

Інші аспекти валідаційної програми розглянуто вище.

3.5. Розділювальні методи

3.5.1. Тонкошарова хроматографія (2.2.27)

Ця хроматографічна техніка широко застосовується Фармакопеею для ідентифікації із використанням стандартного зразка, а також для граничного визначення домішок із та без використання стандартного зразка. Коли домішки визначають кількісно, використовують необхідне обладнання. Зазвичай як нерухому фазу використовують силікагель, однак також використовують звернену нерухому фазу, тобто силанізований силікагель, і целюлозу.

Наступні пункти є спільними для методу тонкошарової хроматографії, незалежно від його використання для ідентифікації, визначення вмісту домішок або для кількісного визначення.

- *Специфічність.* Для випробувань ідентифікації зазвичай не можна домогтися специфічності, використовуючи тільки тонкошарову хроматографію (ТШХ), однак достатня вибірність зазвичай очікується. Цей метод може бути поєднаним з іншими методами. Якщо для граничного випробування вибірність недостатня, то використовують додаткове/додаткові випробування для контролю домішки (домішок), зона якої не була відділена від інших зон. Необхідно довести вибірність сукупності використовуваних методик. Для випробувань ідентифікації поліпшення вибірності може бути досягнуте в разі обприскування реактивом, який дозволяє розрізняти близькі сполуки за кольором.
- *Стаціонарна фаза.* Необхідно показати, що це випробування придатне для проведення аналізу на пластинках одного типу, але різного походження. Якщо можливо, треба уникати використання методик, для яких необхідне розділення досягається тільки на пластинках одного походження.
- *Придатність хроматографічної системи.* Таке випробування зазвичай проводиться для підтвердження розділення двох сполук, які близько елюються, однією з яких є аналізована речовина (критична пара). Необхідно довести, що розділення вибраних сполук гарантує придатність системи для досягнення поставлених цілей. Ця вимога критична для випробувань на вміст домішок.

Для випробувань на вміст супровідних домішок необхідно враховувати таке.

- *Виявлення.* Необхідно уникати використання особливих обприскувальних реагентів, якщо в методиці не використовується стандарт нормованої домішки.
- *Межа виявлення.* Якщо використовують кількісну інструментальну методику, для визначення межі виявлення використовують підходи, описані вище. Якщо використовують візуальну методику, то необхідно показати, що виявляється кількість, відповідна зазначеній межі виявлення.
- *Коефіцієнт перерахунку.* Якщо домішки доступні, то необхідно показати, що їх коефіцієнти перерахунку відносно основної речовини близькі в умовах виявлення. Для випробувань на допустимі межі домішок відмінності в чутливості можуть бути показані шляхом порівняння меж виявлення.

Межа кількісного визначення, лінійність, діапазон і збіжність. Ці дані необхідно подавати в разі використання інструментальної кількісної ТШХ.

3.5.2. Рідинна хроматографія (2.2.29)

Ця хроматографічна техніка використовується у варіанті зовнішнього стандарту (зазвичай це підходить розбавлення випробовуваного розчину) для визначення домішок у субстанціях, для кількісного визначення (з використанням зовнішнього стандарту) та в деяких випадках для ідентифікації у комплексі з іншими методиками. Водночас необхідно враховувати низку особливостей цього методу.

3.5.2.a. Ідентифікація

Специфічність. Для випробувань ідентифікації зазвичай не можна домогтися специфічності, використовуючи лише саму рідинну хроматографію ~~саму по собі~~, проте очікується висока вибірність. Для забезпечення специфічності, рідинна хроматографія може бути поєднана з іншими методами.

Вибірність має бути показана для часів утримування, відносних утримувань або для коефіцієнтів розподілу мас для аналізованої речовини і близьких за будовою речовин. Ці дані необхідно подавати для декількох стаціонарних фаз одного типу.

3.5.2.b. Випробування на граничний вміст домішок

- **Специфічність:**

- *Вибірність розділення.* Має бути показано розділення відомих і можливих домішок з основною речовиною і, якщо можливо, між собою. Специфічність може бути підтверджена в разі використання для детектування мас-спектрометра. Домішки, які не відділяються від основної речовини, мають контролюватися іншим методом. Необхідно подавати дані про час утримування, відносний час утримування або коефіцієнт розподілу мас для основної речовини і домішок. Ці дані мають подаватися для декількох стаціонарних фаз одного типу.
- *Вибірність детектувальної системи.* Вибір детектора і умов детектування має бути обґрунтований. Специфічність може бути підтверджена, наприклад, в разі використання для детектування мас-спектрометра.

- **Коефіцієнт перерахунку.** Якщо домішки доступні, необхідно показати, що чутливості визначення домішки й основної речовини близькі (в разі використання УФ-детектування — за вибраної довжини хвилі детектування; це необхідно показати і для інших типів детекторів — наприклад, рефрактометричного або кондуктометричного). Якщо відношення чутливостей відомої домішки і основної речовини виходить за межі 0.8–1.2 і якщо допустима межа вмісту цієї домішки більше 0.1 %, то необхідно використовувати коефіцієнт перерахунку або стандарт нормованої домішки як зовнішній стандарт.

- **Межа виявлення або кількісного визначення.** Ці межі мають визначатися для методу зовнішнього стандарту в разі використання розведень випробовуваної субстанції або в разі використання стандарту домішки. Якщо пік домішки виходить у безпосередній близькості від піка субстанції (особливо якщо безпосередньо за ним), то межа виявлення або кількісного визначення має встановлюватися за цією домішкою. Для обчислення обох зазначених меж використовують один із методів, описаних вище.
- **Стабільність.** Необхідно подавати дані, що підтверджують термін придатності випробовуваного розчину і розчину порівняння.
- **Ступінь витягу.** У разі використання екстракції необхідно вивчити ступінь витягу відомих і доступних домішок за оптимальних умов. Необхідно подати дані, які підтверджують, що екстракція забезпечує достатню прецизійність.
- **Одержання похідних.** Якщо використовують перед- або післяколонкове одержання похідних, необхідно встановити оптимальні умови реакції (час, температура) і дослідити стабільність одержаних похідних в умовах виконання методики.

Придатність хроматографічної системи. Як описано для ТШХ. Використання співвідношення «сигнал/шум» вимагається лише тоді, коли межа визначення і нормована межа вмісту домішки близькі.

3.5.2.c. Кількісне визначення

- **Специфічність.** Це бажана, але не основна вимога. Якщо метод не специфічний, то можливість його використання забезпечується низьким рівнем вмісту домішок, які контролюються іншим випробуванням.
- **Придатність хроматографічної системи.** Як описано в загальній статті «Методи хроматографічного розділення» (2.2.46). Водночас Табл. 2.2.46.-1 цієї статті може бути доповнена даними Табл. 3.1.

Таблиця 3.1

Вимоги до збіжності паралельних інжекцій

	Кількість паралельних хроматограм				
	3	4	5	6	10
В (%)	Максимально допустиме стандартне відхилення				
1.0	0.21	0.30	0.37	0.42	0.60
1.5	0.31	0.44	0.55	0.64	0.90

2.0	0.41	0.59	0.73	0.85	1.20
2.5	0.52	0.74	0.92	1.06	1.51
3.0	0.62	0.89	1.10	1.27	1.81
3.5	0.72	1.04	1.22	1.48	2.11
4.0	0.83	1.19	1.46	1.70	2.41
4.5	0.93	1.33	1.65	1.91	2.71
5.0	1.04	1.48	1.83	2.12	3.01

Граничні випробування і кількісне визначення мають бути валідовані як описано вище для лінійності, збіжності і відтворюваності.

3.5.3. Газова хроматографія (2.2.28)

3.5.3.a. Ідентифікація

Специфічність. Як описано вище для рідинної хроматографії.

3.5.3.b. Випробування на граничний вміст домішок

- **Специфічність.** Як описано вище для рідинної хроматографії.
- **Коефіцієнт перерахунку.** Як описано вище для рідинної хроматографії. Мають бути надані коефіцієнти перерахунку нормованої домішки відносно основної речовини. Це особливо важливо в разі використання селективних детекторів, таких як детектор з електронного захвату, азотно-фосфорний детектор тощо.
- **Межі виявлення і кількісного визначення.** Як описано вище для рідинної хроматографії.
- **Стабільність.** Як описано вище для рідинної хроматографії.
- **Отримання похідних.** Як описано вище для рідинної хроматографії.
- **Внутрішній стандарт.** Необхідно показати, що за обраних умов пік внутрішнього стандарту не перекривається піками можливих домішок або основної речовини.
- **Ступінь витягу.** Як описано вище для рідинної хроматографії.

3.5.3.c. Придатність хроматографічної системи

Нижче наводяться деякі особливості, які необхідно враховувати для цього тесту.

- **Співвідношення «сигнал/шум».** Зазвичай визначають для сигналів, рівних або дещо більших за межу виявлення і межу кількісного визначення.
- **Ступінь розділення.** Визначають для піка аналізованої речовини і найближчого піка домішки або для піка аналізованої речовини і піка внутрішнього стандарту. Якщо коефіцієнт асиметрії відрізняється від прийнятого діапазону (0.8–1.2), доцільно нормувати його межі (2.2.46). Це особливо важливо в тому разі, коли використовуються набивні колонки або пік нормованої домішки елюється безпосередньо за піком основної речовини. Там, де можливо, підтверджують виконання випробування з використанням різних колонок подібного типу.
- **Метод аналізу рівноважної парової фази.** Цей метод застосовують для аналізу легколетких речовин. Необхідно показати, що вибрані температура і час попереднього нагрівання посудин із випробовуваним зразком забезпечують установаження рівноваги. Треба вивчити вплив матриці. Умови інжекції для методу парової фази валідують шляхом виконання декількох послідовних екстракцій у парову фазу (після кожної інжекції газову фазу над зразком вентилюють і випробовуваний зразок знов урівноважують перед наступною інжекцією газової фази). Показником гарних обраних умов аналізу є наявність лінійності для логарифмів площ піків аналіту для послідовних інжекцій із тангенсом кута нахилу 1.0. Ефекти впливу матриці можна усунути в разі використання методу стандартних добавок.

3.5.3.d. Кількісне визначення

- **Специфічність.** Як описано вище для рідинної хроматографії.
- **Придатність хроматографічної системи.** Як описано вище для рідинної хроматографії.

Граничні випробування і кількісне визначення валідують, як описано вище (див. розділ 2) для лінійності, збіжності і відтворюваності.

3.5.3.e. Ідентифікація і контроль залишкових розчинників (2.4.24)

Пробопідготовка і застосована газохроматографічна система валідуються для досліджуваної субстанції за такими характеристиками:

- специфічність;
- межа виявлення і межа кількісного визначення;
- ступінь витягу;

- прецизійність;
- лінійність для кількісних визначень.

3.6. Визначення води напівмікрометодом (2.5.12)

Є декілька комерційних реактивів Карла Фішера, тому важливо продемонструвати їх придатність для застосування з використанням валідаційної процедури, наприклад методом стандартних добавок.

Метод добавок

Визначають вміст води (m_{H_2O} , мг) у субстанції відповідно до методики, зазначеної в окремій статті. Потім до випробовуваного зразка додають, запобігаючи впливу атмосферної вологи, підхожий об'єм стандартизованого розчину води в метанолі P і визначають вміст води (m_i , мг). Визначення проводять не менше п'яти разів.

Методом найменших квадратів розраховують параметри лінійної залежності знайденого вмісту води від кількості доданої води: тангенс кута нахилу (b), точку перетину з віссю ординат (a) і точку перетину екстрапольованої калібрувальної прямої із віссю абсцис (d).

Значення тангенса кута нахилу b має бути в межах від 0.975 до 1.025 ($\pm 2.5\%$). Відносні похибки e_1 і e_2 , у відсотках, обчислюють за формулами:

$$e_1 = \frac{a - m_{H_2O}}{m_{H_2O}} \cdot 100;$$

$$e_2 = \frac{d - m_{H_2O}}{m_{H_2O}} \cdot 100$$

e_1 і e_2 не мають перевищувати $\pm 2.5\%$.

Для кожного з визначень розраховують знайдену кількість у відсотках від доданої кількості. Середнє значення для п'яти визначень має становити від 97.5% до 102.5%.

3.7. Об'ємне титрування (2.5.11, 2.2.19, 2.2.20)

Під час розробки нової методики об'ємного кількісного визначення рекомендується проводити титрування в умовах методики не менше 7 зразків у випадковому порядку з точкою еквівалентності в діапазоні від 20% до 90% об'єму використовуваної бюретки.

Отримані дані обробляють статистично і порівнюють із низкою критеріїв, які мають виконуватися для оцінювання прийнятності методики титрування.

Відносна похибка зчитування маси на вагах і об'єму кінцевої точки титрування має бути менше 0.5 % відносних.

За допомогою методу найменших квадратів отримують лінійну залежність:

$$V_i = a_{obs} + b_{obs} \cdot m_i, \quad (3.1)$$

де V_i — об'єм титрування в мл наважки масою m_i в мг (у перерахунку на суху речовину).

Регресія (3.1) характеризується нахилом b_{obs} , відрізком, відтинаним на осі ординат a_{obs} , і залишковим стандартним відхиленням $\sigma(V)$.

Критерій 1 — пропорційна систематична похибка (відхилення)

Нахил отриманої прямої b_{obs} , з урахуванням концентрації титранту, має відрізнятись від теоретичного значення b_{theor} не більш ніж на 0.3 % для потенціометричного титрування і не більш ніж на 0.5 % для індикаторного, тобто:

потенціометричне титрування

$$100 \cdot \left| \frac{b_{obs} - b_{theor}}{b_{theor}} \right| \leq 0.3\%; \quad (3.2)$$

індикаторне титрування
Тут

$$100 \cdot \left| \frac{b_{obs} - b_{theor}}{b_{theor}} \right| \leq 0.5\%. \quad (3.3)$$

$$b_{theor} = \frac{Z}{M_r \cdot C_r}, \quad (3.4)$$

де

M_r — відносна молекулярна маса аналізованої речовини;

Z — стехіометричний коефіцієнт реакції титрування;

C_r — молярність титранту.

Критерій 2 — додаткова систематична похибка (відхилення)

Відрізок, відтинаний на осі ординат a_{obs} , має задовольняти вимоги:

потенціометричне титрування

$$100 \cdot \left| \frac{a_{obs}}{V_T} \right| \leq 0.4\%; \quad (3.5)$$

індикаторне титрування

$$100 \cdot \left| \frac{a_{obs}}{V_T} \right| \leq 0.6\%. \quad (3.6)$$

де V_T — номінальний об'єм титрування.

Критерій 3 — точність (статистична похибка)

Залишкове стандартне відхилення $\sigma(V)$ точок навколо прямої (3.1) має задовольняти співвідношення:

$$\text{потенціометричне титрування} \quad 100 \cdot \frac{\sigma(V)}{V_T} \leq 0.3\%; \quad (3.7)$$

$$\text{індикаторне титрування} \quad 100 \cdot \frac{\sigma(V)}{V_T} \leq 0.5\%. \quad (3.8)$$

Тут

$$\sigma(V) = \sqrt{\frac{\sum (V_i - a_{obs} - b_{obs} \times m_i)^2}{n - 2}}. \quad (3.9)$$

Критерій 4 — практична відносна похибка

Для деяких методик титрування можуть не виконуватися *Критерії 1 і 2*, але точність їх для номінального об'єму (8 мл \pm 1 мл для бюретки місткістю 10 мл) може бути цілком прийнятною. У цьому разі розраховують відносну правильність лінійної регресії для номінального об'єму титрування за формулою:

$$\Delta \bar{V} = \left| \frac{a_{obs}}{V_T} + \frac{b_{obs} - b_{theor}}{b_{theor}} \right| \cdot 100\%. \quad (3.10)$$

Величина $\Delta \bar{V}$ не має перевищувати значень, наведених у Табл. 3.2.

У тому разі, коли методика добре обґрунтована, достатньо просто перевірити, що її збіжність (відносне стандартне відхилення RSD , %) і правильність ($\Delta \bar{V}$) для не менше 6 паралельних титрувань задовольняють вимоги Табл. 3.2.

Таблиця 3.2

Вимоги до метрологічних характеристик титрометричних методик під час проведення їх валідації

№	Вид титрування	Допуски вмісту (%), \pm	Збіжність RSD_{rep} , %, \leq	Правильність, $\Delta \bar{V}$, %, \leq
1.	Кислотно-основне	1.0	0.33	0.67

2.	Неводне	1.0	0.33	0.67
3.	Титрування спряжених основам кислот	1.0	0.33	0.67
4.	Окисно-відновне	1.5	0.50	1.0
5.	Аргентометричне	1.5	0.50	1.0
6.	Комплексонометричне	2.0	0.67	1.33

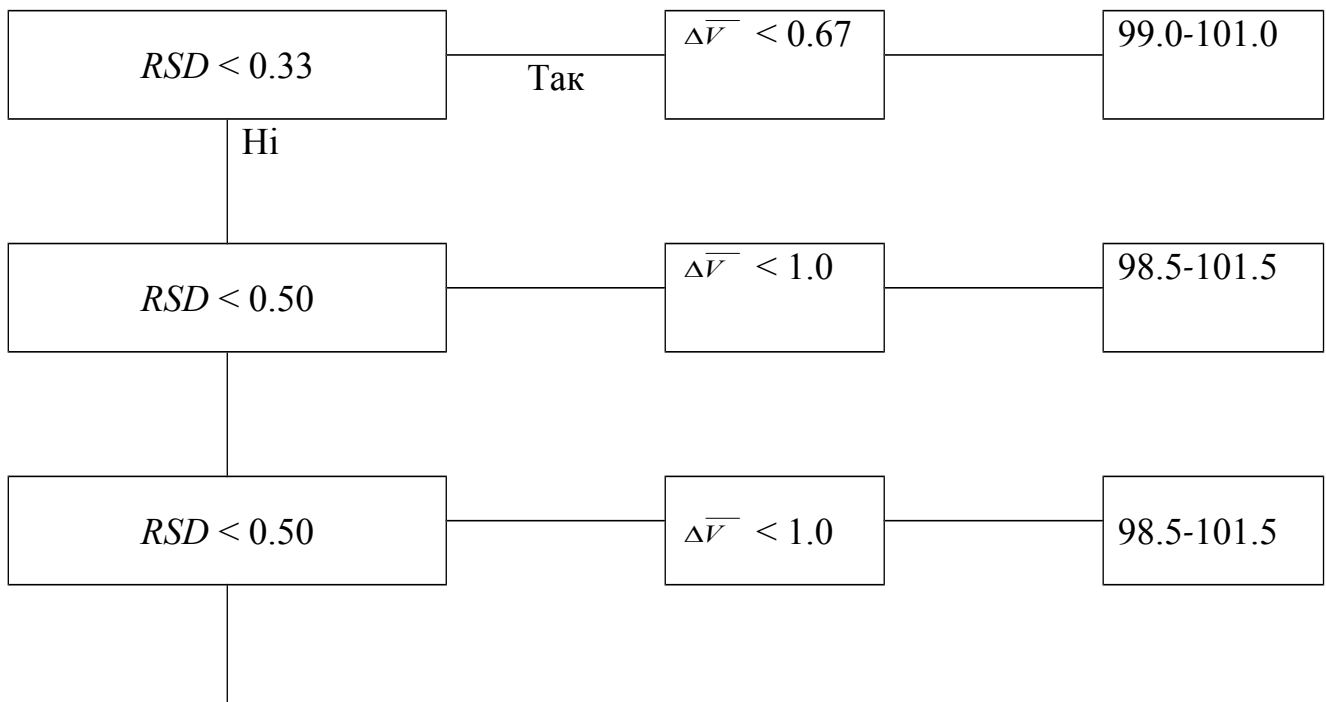
Цифри наведені в Табл. 3.2 як довідкові, і може бути показана можливість застосування **жорсткіших** вимог. Використання об'ємного титрування можливе тільки **тоді**, коли показано, що домішки присутні на низькому рівні. **У** протилежному випадку мають застосовуватися інші методи кількісного визначення.

Дерево ухвалення рішень для валідації методик об'ємного титрування

Збіжність — це відносне стандартне відхилення більше 6 повторних вимірювань: $RSD, n = 6$.

Правильність розраховують за співвідношенням:

$$\Delta \bar{V} = \left| \frac{\bar{V} - V_{theory}}{V_{theory}} \right| \cdot 100\%. \quad (3.11)$$



Інший метод

3.8. Ідентифікація пептидів методом ядерного магнітного резонансу (2.2.64)

Під час проведення валідації слід ураховувати такі фактори.

- Демонстрація спектральної сумісності всередині прийняттого діапазону. Одержаний спектр має бути незалежним від кількості зразка, його рН, температури аналізу (похибки калібрування або зміни під час рекалібрування) або хибного налаштування одержаних спектральних параметрів, таких як ширина імпульсу. Має бути обговорений вплив малих змін у процедурі пробопідготовки, таких як обмін дейтерію. Для демонстрації спектральної сумісності мають бути включені результати аналізу ряду різних серій випробовуваного продукту.
- Специфічність. Спектр випробовуваного зразка слід порівняти зі спектрами інших подібних продуктів, відібраних на виробничій дільниці, і він має відрізнитися від них (з зауваженнями про явні спектральні відмінності). Спектри потенційних домішок можуть бути оцінені (особливо для специфікованих домішок). Це можуть бути деамідовані форми, модифікації, які вміщують енантіомери з «помилковими» амінокислотами, або форми з некоректними послідовностями. Цей підхід має бути подібним тому, що використовувався під час оцінювання специфічності випробувань на хроматографічну ідентичність.
- Інша варіабельність
 - Варіабельність, пов'язана зі зміною оператора, очікується невеликою. Вона має бути підтверджена, якщо випробування виконує більш ніж один оператор.
 - Дрейф спектрометра в часі, можливо незначний.

Невелика ревалідація потрібна після обслуговування зонда або пульта управління, модернізації програмного забезпечення або закупівлі нових компонентів спектрометра. Часто це може бути досягнуто з використанням стандартних зразків, які постачаються разом зі спектрометром.