

С. РЕКОМЕНДАЦІЇ ДЕРЖАВНОЇ ФАРМАКОПЕЇ УКРАЇНИ: СТАНДАРТИЗОВАНІ ПРОЦЕДУРИ ВАЛІДАЦІЇ КІЛЬКІСНИХ МЕТОДИК КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ

Валідація аналітичної методики полягає в отриманні валідаційних характеристик, порівнянні їх із критичними значеннями і висновку про прийнятність цієї методики для розв'язання поставлених завдань. Тому валідація методики обов'язково передбачає формулювання і обґрунтування критеріїв прийнятності (що таке «добре» і що таке «погано»).

У попередніх розділах описані терміни і визначення, а також валідаційні характеристики, які мають розглядатися під час проведення валідації аналітичних методик, що включаються до реєстраційних документів. Однак у них, за рідким винятком, не наводяться інструкції, як потрібно проводити валідацію конкретних аналітичних методик і які критерії прийнятності валідаційних характеристик за таких умов необхідно використовувати. Останні мають розробляти самі користувачі з урахуванням специфіки методик, що валідуються (див. розділ 2.1). При цьому можуть бути застосовані різні наукові підходи, які ґрунтуються на різних принципах.

Нижче наводяться стандартизовані процедури валідації кількісних методик контролю якості лікарських засобів. Вони ґрунтуються на систематичному застосуванні нормалізованих координат, лінійної статистичної моделі, принципу незначущості, понять доказового і підтверджуючого підходів, а також понять практичної незначущості систематичної похибки. Теоретичні положення ілюструються прикладами їх практичного застосування для валідації реальних методик.

Застосування користувачами описаних критеріїв у межах стандартизованих процедур не потребує додаткового обґрунтування. Вони мають рекомендаційний характер і не є вичерпними і/або виключними. Користувач може використовувати будь-які підходи. У такому разі критерії прийнятності валідаційних характеристик мають бути науково обґрунтовані.

4. КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ У ВАРІАНТІ МЕТОДУ СТАНДАРТУ

4.1. Нормалізовані координати

Нехай C_i — концентрація речовини, що аналізується, у i -му випробовуваному розчині (або зразку), C_{st} — концентрація тієї самої речовини в розчині (або зразку) порівняння (вважається, що вона дуже близька до номінальної або нормованої концентрації). Аналогічно: A_i — аналітичний сигнал (наприклад, висота або площа піка в хроматографії, оптична густина в спектрофотометрії тощо) речовини, що аналізується, для i -го розчину, що аналізується; A_{st} — аналітичний сигнал тієї самої речовини для розчину порівняння. Нормалізовані координати X_i , Y_i і Z_i визначаються так:

$$X_i = \frac{C_i}{C_{st}} \times 100\%, \quad Y_i = \frac{A_i}{A_{st}} \times 100\%, \quad Z_i = \frac{Y_i}{X_i} \times 100\%. \quad (4.1)$$

Тут

X_i — концентрація речовини, що аналізується, у i -му випробовуваному розчині, у відсотках до концентрації тієї самої речовини в розчині порівняння;

Y_i — аналітичний сигнал речовини, що аналізується, для i -го випробовуваного розчину, у відсотках до аналітичного сигналу тієї самої речовини для розчину порівняння;

Z_i — відношення «знайдено/введено» у відсотках.

Нормалізовані координати дозволяють сформулювати єдині критерії прийнятності валідаційних характеристик для всіх речовин, що аналізуються, незалежно від їх природи і концентрації.

4.2. Процедура і діапазон

Валідаційні характеристики рекомендується отримувати на підставі результатів дослідження лінійності, що дозволяє суттєво зменшити обсяг експерименту. Мінімально достатнім є використання $g = 9$ точок, які розподілені з рівномірним кроком у межах діапазону (D) застосування методики, який різниться для різних тестів (див. Табл. 4.1).

Зокрема, для кількісного визначення готують модельні розчини з концентраціями $X_i = 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115$ і 120 % до номінальної. Паралельно готують розчин порівняння з концентрацією, близькою до номінальної.

Ці модельні, а також стандартний розчини аналізують в умовах методики, що валідується, отримуючи аналітичні сигнали A_i і A_{st} . Концентрацію й аналітичний сигнал розчину порівняння використовують для переходу до нормалізованих координат відповідно до співвідношень (4.1). У такий спосіб отримують $g = 9$ точок, кожна з яких — це аналіз в умовах методики, що валідується.

4.3. Дослідження лінійності

Отримані нормалізовані величини X_i і Y_i обраховують методом найменших квадратів, отримуючи лінійну залежність

$$Y_i = b \times X_i + a. \quad (4.2)$$

У методі калібрувального графіка використовують для розрахунків зворотне рівняння:

$$X_i = b' \times Y_i + a' \quad (4.2a)$$

Для цих прямих розраховують стандартні відхилення вільного члена s_a і кутового коефіцієнта s_b , а також такі метрологічні характеристики.

Стандартне відхилення SD_{range} усіх $g = 9$ нормалізованих абсцис X_i навколо середнього значення \bar{X} :

$$SD_{range} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^g (X_i - \bar{X})^2}{g-1}} \quad (4.3)$$

Величини SD_{range} для різних діапазонів застосування наведені в Табл. 4.1.

Залишкове стандартне відхилення SD_o усіх $g = 9$ нормалізованих ординат Y_i навколо прямих (4.2) і (4.2a) у методі стандарту має вигляд:

$$SD_o = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^g (Y_i - b \times X_i - a)^2}{g-2}} \approx \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^g (X_i - b' \times Y_i - a')^2}{g-2}} \quad (4.4)$$

Загальний індекс кореляції R_c :

$$R_c = \sqrt{1 - \frac{SD_o^2}{SD_{range}^2}} \quad (4.5)$$

Величини Z_i співвідношення (4.1) для точок ($g = 9$) лінійної залежності (4.2) характеризуються середнім значенням \bar{Z} і стандартним відхиленням SD_Z , яке, урахувавши близькість величини \bar{Z} до 100 %, фактично є відносним стандартним відхиленням. Тому відносна невизначеність методики аналізу у всьому діапазоні концентрацій характеризується довірчим інтервалом, рівним довірчому інтервалу одиничного значення Z :

$$\Delta_{As} = t(95\%, g-1) \times SD_Z = 1.860 \times SD_Z \quad (4.6)$$

Тут 1.86 — коефіцієнт Стюдента для однобічного розподілу, довірчої ймовірності 95 % і числа ступенів свободи $g - 1 = 9 - 1 = 8$.

4.4. Критерії прийнятності валідаційних характеристик аналітичної методики

4.4.1. Критерії прийнятності повної відносної невизначеності методики аналізу Δ_{As}

Принцип незначущості. Довірчий інтервал Δ_2 є незначущим порівнюючи з довірчим інтервалом Δ_1 на рівні 95 %, якщо виконується співвідношення (див. «Статистичний аналіз результатів хімічного експерименту» (5.3.N.1), підрозділ 2.4.2.1 «Принцип незначущості»):

$$\Delta_2 \leq 0.32 \times \Delta_1. \quad (4.7)$$

У цьому разі їх об'єднаний довірчий інтервал збільшується порівнюючи з Δ_1 не більш ніж на 5 %.

Контроль якості фармацевтичних субстанцій і готових лікарських засобів (ГЛЗ) має принципові відмінності (див. 5.3.N.1, розділ 2.3 «Особливості контролю якості лікарських засобів за показником “Кількісне визначення”»).

Підтверджуючий підхід. Концентрація домішок у субстанціях зазвичай невелика (крім води) і є незначущою порівнюючи з допусками вмісту основної речовини за специфікацією. Тому під час кількісного визначення субстанцій не переслідують/немає мети знайти фактичну концентрацію основної речовини (це можна зробити, віднімаючи від 100 % вміст домішок, який отримується в інших тестах специфікації). Необхідно підтвердити, що знайдений вміст основної речовини значуще (зазвичай для ймовірності 95 %) не відрізняється від 100 % (підтверджуючий підхід). Тому допустима невизначеність аналітичної методики (Δ_{As}) для фармацевтичних субстанцій не може бути більше перевищення верхнього допуску вмісту основної речовини над 100 %. У разі симетричних допусків величина Δ_{As} не може бути ширше допусків ($\pm B$ %) вмісту основної речовини за специфікацією ($100 \pm B$ %). Тобто допуски вмісту в цьому разі повністю визначаються максимально допустимою невизначеністю методики за специфікацією.

Доказовий підхід. У разі ГЛЗ вміст діючої речовини, що знаходиться в результаті аналізу за методикою, визначається не тільки точністю методики, але й іншими факторами, серед яких найважливішими є технологічні (зокрема, неоднорідність вмісту). Тому під час проведення контролю якості ГЛЗ важлива фактична концентрація речовини, що аналізується (яка може коливатися в дуже широких межах). Відповідно до принципу незначущості (див. вище), для цього невизначеність методики аналізу ГЛЗ має бути незначущою порівнюючи з допусками вмісту (доказовий підхід). У цьому разі вона значуще не впливає на прийняття/ухвалення рішень про якість.

Отже, ураховуючи поняття підтверджуючого і доказового підходів і принцип незначущості (4.7), повна відносна невизначеність методики аналізу

лікарського засобу (Δ_{As} , %) пов'язана з симетричними допусками вмісту (B) речовини, що аналізується, співвідношеннями:

субстанції:
$$\Delta_{As} (\%) \leq \max \Delta_{As} = B. \quad (4.8)$$

ГЛЗ:
$$\Delta_{As} (\%) \leq \max \Delta_{As} = 0.32 \times B. \quad (4.9)$$

Величини $\max \Delta_{As}$ для різних допусків вмісту B наведені в Табл. 4.1.

4.4.2. Правильність. Статистична і практична незначущість систематичної похибки

Статистичні аспекти цього питання докладно розглянуті в розділі 5.3.N.1, 2.4 «Оцінка значущості систематичної похибки».

Зазвичай вимогою до систематичної похибки (δ) є її статистично незначуща відмінність від нуля — тобто вона не має перевищувати випадкову складову невизначеність результату аналізу. Це означає, що δ не має перевищувати довірчий інтервал середнього значення \bar{Z} , тобто має виконуватися нерівність ($g = 9$):

статистична незначущість:
$$\delta \% = |\bar{Z} - 100| \leq \Delta_{\bar{Z}} = \frac{\Delta_{As}}{\sqrt{g}} = \frac{\Delta_{As}}{3}. \quad (4.10)$$

Зі співвідношення (4.10) видно, що критерій статистичної незначущості систематичної похибки залежить від фактичної невизначеності методики аналізу Δ_{As} , роблячись жорсткішим із її зменшенням (тобто з підвищенням точності). Однак ця вимога не є коректною, оскільки, чим вище точність методики аналізу (наприклад, за рахунок більшого числа паралельних випробувань), тим менші значення δ стають статистично значущими. Навпаки, зменшуючи точність результатів аналізу (наприклад, зменшуючи кількість паралельних випробувань), можна навіть велику величину δ зробити такою, яка незначущо відрізняється від нуля.

Тому під час проведення валідації більш коректним є використання поняття практичної незначущості систематичної похибки. Систематична похибка δ є практично незначущою для розв'язання поставленого аналітичного завдання контролю якості лікарського засобу, якщо вона є незначущою порівнюючи з максимально допустимою невизначеністю методики $\max \Delta_{As}$ зі співвідношень (4.8-4.9), тобто

практична незначущість:

субстанції:
$$\delta (\%) \leq \max \delta = 0.32 \times \max \Delta_{As} = 0.32 \times B. \quad (4.11)$$

ГЛС:
$$\delta (\%) \leq \max \delta = 0.32 \times \max \Delta_{As} = 0.10 \times B. \quad (4.12)$$

Зі співвідношень (4.11-4.12) видно, що критерій практичної незначущості систематичної похибки залежить тільки від допусків вмісту і не залежить (на відміну від статистичної незначущості) від фактичної невизначеності методики аналізу Δ_{As} . Величини $\max \delta$ наведені в Табл. 4.1.

Здебільшого вимоги (4.11-4.12) практичної незначущості систематичної похибки значно більш ліберальні, ніж вимоги (4.10) статистичної незначущості.

4.4.3. Критерії прийнятності лінійної залежності

Нижче розглядаються критерії для процедури проведення валідації (розділ 4.2), яка передбачає використання $g = 9$ точок, однак вони можуть бути отримані для будь-якого числа точок.

4.4.3.1. Залишкове стандартне відхилення SD_o

Довірчий інтервал розкиду точок навколо прямої $Y_i = b \times X_i + a$ дорівнює $t(95\%, g - 2) \times SD_o$ і являє собою (у разі використання стандартизованої процедури розділу 4.2) довірчий інтервал невизначеності методики аналізу (Δ_{As}), який має задовольняти нерівності (4.8-4.9). Ураховуючи це, отримаємо:

$$\text{субстанції:} \quad \Delta_{As} = t(95\%, g - 2) \times SD_o \leq \max \Delta_{As} = B. \quad (4.13)$$

$$\text{ГЛЗ:} \quad \Delta_{As} = t(95\%, g - 2) \times SD_o \leq \max \Delta_{As} = 0.32 \times B. \quad (4.14)$$

Звідси отримаємо вимоги до залишкового стандартного відхилення SD_o ($g = 9$):

$$\text{субстанції:} \quad SD_o \leq B / t(95\%, g - 2) = 0.53 \times B. \quad (4.15)$$

$$\text{ГЛЗ:} \quad SD_o \leq 0.32 \times B / t(95\%, g - 2) = 0.17 \times B. \quad (4.16)$$

У разі тестів «Однорідність вмісту» і «Розчинення» гранична невизначеність методики аналізу $\max \Delta_{As} = 3.0\%$, що відповідає формальним допускам вмісту $B = 9.3\%$. Цю величину і слід підставляти для цих тестів у співвідношення (4.16).

4.4.3.2. Коефіцієнт кореляції

Підставляючи співвідношення (4.5) для коефіцієнта кореляції R_c , величини $\max SD_o$ і SD_{range} із Табл. 4.1, можна отримати його мінімально допустимі критичні значення. Результати таких розрахунків $\min R_c$ для різних випробувань, $g = 9$ точок і різних допусків вмісту B наведені в Табл. 4.1.

Іноді зручно проводити валідацію методики, яка була б придатна одночасно для проведення випробувань «Кількісне визначення» (КВ), «Однорідність вмісту» (ОВ) і «Розчинення» (Р). У цьому разі як допуски вмісту (B) необхідно вибирати мінімальні (із вимог для випробувань КВ, ОВ і Р) значення (зазвичай

це вимоги для КВ), відповідні їм значення SD_o , критичні значення a для випробування Р (як такого, що має найменшу нижню межу діапазону), а критичні значення R_c розраховувати з цих величин і реального максимально широкого діапазону (зазвичай це значення для Р). Результати таких розрахунків також наведені в Табл. 4.1.

4.4.3.3. Вільний член. Статистична і практична незначущість

Відрізок, що відсікається на осі ординат (вільний член прямої - a), характеризує систематичну похибку у разі аналізу методом стандарту. Відповідно до розділу 4.4.2 вимоги до нього можуть бути двох типів.

1. *Статистично* незначуща відмінність від нуля: величина a має бути менше довірчого інтервалу своєї невизначеності, тобто ($g = 9$):

статистична незначущість:

$$a \leq t(95\%, g - 2) \times s_a = 1.89 \times s_a. \quad (4.17)$$

Тут s_a — стандартне відхилення вільного члена прямої (a), знайдене методом найменших квадратів.

2. *Практично* незначуща відмінність від нуля: величина a є практично незначущою для розв'язання поставленого завдання, якщо систематична похибка, яку вона вносить, не перевищує максимальних допустимих значень $\max \delta$ (4.11-4.12). У нормалізованих координатах критерій практичної незначущості величини a для методу стандарту має вигляд:

практична незначущість:

$$|a| \leq \frac{\max \delta}{1 - (X_{\min} / 100)} = \frac{0.32 \times \max \Delta_{As,r}}{1 - (X_{\min} / 100)}. \quad (4.18)$$

Тут X_{\min} — мінімальна межа діапазону застосування методики (у нашому випадку це 80, 70, 50 або 55 %), а величина Δ_{As} має задовольняти співвідношення (4.8-4.9, 4.13-4.14).

Вираз (4.18) застосовують тоді, коли не виконується критерій статистичної незначущості (4.17). Критичні значення a наведені в Табл. 4.1.

4.4.3.4. Межа виявлення (DL) і межа кількісного визначення (QL)

Ці величини не потрібні під час проведення валідації методик кількісного визначення, але вони корисні як інформація про те, наскільки діапазон застосування методики перевищує її граничні можливості («запас міцності» методики). У разі контролю домішок знаходження величин MB і $МКВ$ є обов'язковим.

Відповідно до Європейської Фармакопеї, DL і QL можуть бути розраховані виходячи на підставі стандартного відхилення вільного члена лінійної залежності s_a і її кутового коефіцієнта b :

$$DL = 3.3 \times s_a / b \approx 3.3 \times s_a, \quad (4.19)$$

$$QL = 10 \times s_a / b \approx 10 \times s_a, \quad (4.20)$$

ураховуючи близькість у нормалізованих координатах кутового коефіцієнта b до одиниці.

Використання для розрахунків DL - і QL -характеристик лінійної залежності є більш надійним і коректним, ніж використання відношення «сигнал/шум», оскільки ураховує не тільки шум, але й невизначеність пробопідготовки, яка, наприклад, у разі парофазового аналізу методом газової хроматографії може бути дуже значною.

Якщо лінійна залежність побудована в нормалізованих координатах (тобто $Y_i = b \times X_i + a$), то величини DL і QL знаходяться у відсотках до концентрації розчину порівняння, що дозволяє легко оцінити «запас міцності» методики.

4.4.4. Внутрішньолабораторна прецизійність

Доцільно застосування підтверджуючого підходу — довірчий інтервал результатів (Z), отриманих за різних умов, не має перевищувати максимально допустимої невизначеності методики аналізу $\max \Delta_{As}$ рівнянь (4.13-4.14) і Табл. 4.1. Для цього аналізують за методикою специфікації $n = 5$ зразків (наважок) тієї самої серії досліджуваного препарату в $m = 3$ різних дні. Досліджування проводять різні аналітики, на різному обладнанні (спектрофотометри, хроматографічні колонки тощо). Усі отримані результати (Z_i) мають належати тій самій генеральній сукупності. Тому для них розраховують об'єднане середнє значення (Z_{intra}), стандартне відхилення ($SD_{Z_{intra}}$, %) і відносний довірчий інтервал (Δ_{intra} , %). Величина Δ_{intra} не має перевищувати $\max \Delta_{As}$ рівнянь (4.13-4.14) і Табл. 4.1, тобто

$$\Delta_{intra} = t[95\%, (n \cdot m - 1)] \times SD_{Z_{intra}} = 1.76 \times SD_{Z_{intra}} \leq \max \Delta_{As}. \quad (4.21)$$

У тому разі, коли для аналізу за специфікацією використовують k зразків, величину $SD_{Z_{intra}}$ ділять на \sqrt{k} .

4.4.5. Дослідження стабільності розчинів

Перевірка стабільності випробовуваного розчину і розчину порівняння є одним з елементів дослідження робастності методики і має проводитися перед початком усіх інших валідаційних досліджень. Для проведення кількісного визначення зазвичай достатньо показати, що розчини є стабільними не менше 1 год. Це означає, що систематична похибка δ , яка вноситься нестабільністю цих розчинів, не перевищує граничного значення $\max \delta$ з Табл. 4.1.

У разі проведення випробувань на розчинення і однорідність вмісту часовий інтервал підтвердження стабільності може бути значно більше 1 год. Однак

слід зазначити, що чим ширше часовий інтервал, тим складніше витримати вимоги до стабільності розчинів.

Критерії стабільності різняться для спектрофотометрії і хроматографії.

4.4.5.1. Спектрофотометричний аналіз

У разі спектрофотометричного аналізу методом стандарту (випробовуваний і стандартний розчини готуються одночасно), у загальному випадку, необхідно показати, що змінення відношення оптичних густин випробовуваного і стандартного розчинів (у нормалізованих координатах це змінення величини Y зі співвідношення (4.1)) не перевищує протягом вибраного часового інтервалу максимально допустимої величини систематичної похибки $\max \delta$ з Табл. 4.1.

Наприклад, якщо часовий інтервал становить 1 год, то проводять паралельне вимірювання їх оптичних густин через $t = 0, 15, 30, 45$ і 60 хв, розраховують за рівнянням (4.1) величини Y_t , їх відносне стандартне відхилення ($RSD_t, \%$) і довірчий інтервал ($\Delta_t, \%$) (однобічний коефіцієнт Стьюдента для 4 ступенів свободи і ймовірності 0.95 дорівнює 2.13), який не має перевищувати величини $\max \delta$ з Табл. 4.1, тобто:

$$\Delta_t(\%) = 2.13 \times RSD_t \leq \max \delta . \quad (4.22)$$

Величина $\max \Delta_{As}$ має відповідати вимогам співвідношень (4.8-4.9). Значення $\max \delta$ знаходять зі співвідношень (4.13-4.14) або в Табл. 4.1.

4.4.5.2. Хроматографічний аналіз

У разі хроматографічного кількісного визначення методом стандарту підхід, який описаний вище для спектрофотометрії, принципово неможливий через тривалість хроматографування (одна хроматограма часто займає понад 20 хв). Однак це має і свої переваги для доведення необхідної стабільності розчинів. Дійсно, якщо ми приготували і провели хроматографування 10 розчинів для дослідження лінійності, то цей час значно перевищує час аналізу 1-3 зразків, які зазвичай аналізують на практиці. Тому позитивні результати прецизійності і правильності, які отримані під час дослідження лінійності, є підтвердженням необхідної стабільності розчинів. Другим доказом є практична незначущість різниці ($\leq \sqrt{2} \times \max \Delta_{As}$) величин Z для першого і останнього розчинів, що хроматографуються.

4.4.6. Специфічність

У разі кількісного визначення доведення специфічності означає, що вплив допоміжних речовин і продуктів деградації на невизначеність методики аналізу не перевищує максимально допустимої величини систематичної похибки $\max \delta$ з Табл. 4.1. Вимоги до специфічності різняться для селективних (хроматографія) і неселективних (спектрофотометрія) методик.

4.4.6.1. Хроматографічні методики

У тому разі, коли кількісне визначення проводиться в умовах, описаних для контролю супровідних домішок, доведення специфічності не потрібне — вона вже доведена для методики контролю домішок, де домішки, що контролюються, розділяються з основною речовиною й іншими домішками.

Під час кількісного визначення немає необхідності, щоб домішки розділялися між собою. Достатньо, щоб вони з необхідною точністю відділялися від речовини, що аналізується. Тому в деяких випадках можуть бути запропоновані простіші й швидші методики кількісного визначення. Доведення специфічності для них, у загальному випадку, полягає в доведенні достатнього розділення критичних (за розділенням) піків домішок з речовиною, що аналізується.

4.4.6.2. Спектрофотометричні методики

У разі неспецифічних методик аналізу (наприклад, спектрофотометрії) доведення специфічності методики для розв'язання поставленого аналітичного завдання полягає в доведенні того, що відносна систематична похибка (δ_{noise} , %), яка вноситься домішками (допоміжні речовини і супровідні домішки) у визначення речовини, що аналізується, є незначущою порівнюючи з максимально допустимою невизначеністю методики аналізу ($\max \Delta_{As}$, %), тобто:

$$\delta_{noise} (\%) \leq 0.32 \times \max \Delta_{As} = \max \delta . \quad (4.23)$$

Величини $\max \delta$ наведені в Табл. 4.1.

Для доведення цього можуть бути використані такі підходи.

4.4.6.2.1. Оптичні характеристики домішок відомі

Співвідношення (4.23) можна представити як:

$$\begin{aligned} \delta_{noise} (\%) &= \frac{100 \cdot \sum_{i=1}^k A_{imp,i}}{A^{st} + \sum_{i=1}^k A_{imp,i}} \approx \frac{100 \cdot \sum_{i=1}^k A_{imp,i}}{A^{st}} = \\ &= \delta_{exc} + \delta_{imp} \leq 0.32 \cdot \max \Delta_{As} = \max \delta . \end{aligned} \quad (4.24)$$

У чисельнику стоїть сума оптичних густин (у розведенні, яке узятє за методикою аналізу) усіх домішок і допоміжних речовин для їх гранично допустимих концентрацій у препараті, а в знаменнику — оптична густина розчину порівняння в номінальній концентрації. Величина $\max \Delta_{As}$ має відповідати вимогам співвідношень (4.8-4.9).

Величину δ_{noise} можна представити як суму внесків, пов'язаних із допоміжними речовинами (δ_{exc}) і домішками (δ_{imp}). Як видно зі співвідношення (4.24),

величина δ_{noise} не має перевищувати максимально допустиму систематичну похибку $\max \delta$.

Величина δ_{noise} в цьому разі являє собою інформаційний коефіцієнт (частка оптичної густини) суми домішок за аналітичної довжини хвилі.

Недоліком цього підходу є необхідність знати показники поглинання домішок ~~домішок~~ або їх коефіцієнти перерахунку на речовину, що аналізується, за аналітичної довжини хвилі. Коефіцієнти перерахунку іноді відомі з розділу «Супровідні домішки» специфікації (якщо контроль домішок проводиться методом високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) із використанням спектрофотометричного детектора), але за іншої довжини хвилі.

4.4.6.2.2. Оптичні характеристики домішок невідомі

Якщо для контролю домішок за специфікацією застосовується метод ВЕРХ зі спектрофотометричним детектором, то це може бути використано для доведення специфічності спектрофотометричної методики кількісного визначення.

Частка (у відсотках до речовини, що аналізується) суми домішок, знайдена у випробовуваному розчині методом внутрішньої нормалізації за аналітичної довжини хвилі спектрофотометричного аналізу, не має перевищувати максимально допустиму систематичну похибку $\max \delta$ (див. Табл. 4.1), тобто має виконуватися співвідношення (4.23).

Перевагою такого підходу є те, що спектральні характеристики домішок за таких умов не потрібні (вони можуть бути невідомі).

Недоліком є те, що домішки можуть бути в препараті не в максимально допустимій концентрації. Тому дослідження слід проводити на 5 серіях препарату з граничним терміном придатності або таким, що вже закінчився.

Таблиця 4.1

Критичні значення систематичної ($\max \delta$) і повної невизначеності ($\max \Delta_{As}$) методики аналізу і параметрів лінійної залежності $Y_i = b \times X_i + a$ для різних випробувань, $g = 9$ точок і різних допусків вмісту B

Випробування*	Діапазон D , крок, RSD_{range} , %	B , %	$\max \Delta_{As}$, , %	$\max \delta$, %	$\max SD$ о, %	$\min R_c$	$\max a$, , %
Субстанції							
КВ	80 - 120, крок = 5 $SD_{range} = 13.69$	1.0	1.0	0.32	0.53	0.99926	1.6
		1.5	1.5	0.48	0.79	0.99833	2.4
		2.0	2.0	0.64	1.06	0.99702	3.2
		2.5	2.5	0.80	1.32	0.99535	4.0
		3.0	3.0	0.96	1.58	0.99329	4.8

Готові лікарські засоби							
KB	$D = 80 - 120,$ крок = 5 $SD_{range} = 13.69$	5	1.6	0.51	0.84	0.99810	2.6
		7.5	2.4	0.77	1.27	0.99571	3.8
		10	3.2	1.02	1.69	0.99236	5.1
		15	4.8	1.54	2.53	0.98273	7.7
		20	6.4	2.05	3.38	0.96909	10.2
OB	$D = 70 - 130,$ крок = 7.5 $SD_{range} = 20.54$		3.0	0.96	1.58	0.99710	3.1
P	$D = 50 - 130,$ крок = 10 $SD_{range} = 27.39$		3.0	0.96	1.58	0.99833	1.9
	$D = 55 - 135,$ крок = 10 $SD_{range} = 27.39$		3.0	0.96	1.58	0.99833	2.1
KB + OB + P	$D = 55 - 135,$ крок = 10 $SD_{range} = 27.39$	5	1.6	0.51	0.84	0.99952	2.1
		7.5	2.4	0.77	1.27	0.99893	2.1
		10	3.2	1.02	1.56	0.99837	2.1
		15	4.8	1.54	1.56	0.99837	2.1
		20	6.4	2.05	1.56	0.99837	2.1
KB + OB + P	$D = 60 - 135,$ крок = 9.375 $SD_{range} = 25.67$	5	1.6	0.51	0.84	0.99946	2.4
		7.3	2.34	0.75	1.23	0.99885	2.4
		7.5	2.4	0.77	1.27	0.99878	2.4
		10	3.2	1.02	1.56	0.99814	2.4
		15	4.8	1.54	1.56	0.99814	2.4
		20	6.4	2.05	1.56	0.99814	2.4

* KB — кількісне визначення, OB — однорідність вмісту, P — розчинення.

4.5. Прогноз повної невизначеності методики кількісного визначення

Для підтвердження того, що методика буде відтворюватися в іншій лабораторії, недостатньо результатів валідації в одній лабораторії, оскільки рівень обладнання її може бути значно вище допустимих за Фармакопеею вимог. Необхідним є прогноз повної невизначеності методики аналізу відповідно до цих вимог.

Прогнозована повна невизначеність результатів аналізу не має перевищувати максимально допустимої невизначеності результатів аналізу $\max \Delta_{As}$ (Табл. 4.1). Повну прогнозовану відносну невизначеність методики аналізу розраховують за формулою:

$$\Delta_{As} = \sqrt{\Delta_{SP}^2 + \Delta_{FAO}^2}, \quad (4.25)$$

де Δ_{SP} — невизначеність пробопідготовки; Δ_{FAO} — прогнозована невизначеність кінцевої аналітичної операції.

Невизначеність пробопідготовки Δ_{SP} розраховують за формулою:

$$\Delta_{SP} = \sqrt{\sum_i^n \Delta_{V,i}^2}, \quad (4.26)$$

де $\Delta_{V,i}$ — складова невизначеність, яка пов'язана з конкретною операцією пробопідготовки (узяття наважки, аліквоти малого об'єму, доведення до об'єму в мірній колбі тощо), виражена як однобічний відносний довірчий інтервал для рівня надійності 95 %. Водночас слід використовувати максимально допустиму невизначеність мірного посуду, яка зазначена в Табл. 4.2.

Таблиця 4.2

Вимоги до максимально допустимої невизначеності зважування, мірних колб і піпеток

Ваги		
Невизначеність зважування		0.2 мг
Мірні колби з вузьким горлом		
Об'єм колби, мл	Невизначеність	
	мл	%
10	0.050	0.50
20	0.0057	0.28
25	0.058	0.23
50	0.085	0.17
100	0.12	0.12
200	0.20	0.10
250	0.20	0.080
500	0.035	0.070
1000	0.50	0.050
Піпетки		
Піпетки з однієї позначкою (Мора)		Піпетки градуйовані

Об'єм, мл	Невизначеність		Об'єм, мл	Невизначеність	
	мл	% (на повний об'єм піпетки)		мл	% (на повний об'єм піпетки)
1	0.010	0.98	0.5	0.0061	1.23
2	0.012	0.61	1	0.0074	0.74
5	0.018	0.37	2	0.011	0.57
10	0.025	0.25	5	0.034	0.69
20	0.037	0.18	10	0.057	0.57
25	0.037	0.15	25	0.123	0.46
30	0.062	0.12	—	—	—

Невизначеність кінцевої аналітичної операції Δ_{FAO} можна розраховувати різними шляхами.

4.5.1. Хроматографічний аналіз

У разі хроматографічних методик доцільно виходити з максимально допустимого відносного стандартного відхилення паралельних хроматографувань, регламентованого у специфікації розділом «Придатність хроматографічної системи».

4.5.2. Спектрофотометричний аналіз

У разі спектрофотометричного аналізу вимоги до повторних вимірювань оптичної густини з вийманням кювет зазвичай відсутні, хоча рекомендації під час кваліфікації спектрофотометра ($RSD_A \leq 0.25\%$) є. Тому у разі прогнозу Δ_{FAO} слід використовувати величину ($RSD_A = 0.52\%$) відносного стандартного відхилення оптичної густини з вийманням кювети, отриману у великому міжлабораторному експерименті. Ця величина характеризує ту реальну точність, яка сьогодні характерна для контрольних лабораторій.

Ураховуючи наявність 2 розчинів — випробовуваного і розчину порівняння, — а також рекомендації щодо не менше 3 паралельних вимірювань оптичної густини з вийманням кювети для кожного розчину, отримаємо для спектрофотометричного аналізу:

$$\Delta_{FAO} = \sqrt{2} \times \frac{RSD_A \times 1.65}{\sqrt{3}} = \sqrt{2} \times \frac{0.52 \times 1.65}{\sqrt{3}} = \sqrt{2} \times 0.49 = 0.70\%. \quad (4.27)$$

Тут 1.65 — коефіцієнт Гауса для одnobічної ймовірності 95 %.

Рівняння (4.27) характеризує ту невизначеність кінцевої аналітичної операції спектрофотометричного аналізу, яка є характерною сьогодні для державних лабораторій контролю якості лікарських засобів.

4.6. Передача методики

Передача методик аналізу є обов'язковою умовою в тому разі, коли валідацію проводить не само підприємство, а, наприклад, дослідна установа за договором. Слід зазначити, що цей етап є однією з важливих складових перевірки робастності (оскільки обладнання, мірний посуд, реактиви і виконавці на підприємстві і в дослідній лабораторії різняться), а також міжлабораторної відтворюваності, яка доповнює прогноз повної невизначеності аналізу.

Передачу методики доцільно проводити методом порівняльного аналізу 5 зразків препарату за специфікацією на обладнанні підприємства.

4.6.1. Критерії прийнятності

Доцільно використовувати підтверджуючий підхід: усі значення концентрацій, які розраховані для 5 проаналізованих зразків ($Z_{i, Transfer}$), не мають відрізнятися від середнього значення ($\overline{Z_{intra}}$), знайденого під час проведення валідації на стадії дослідження внутрішньолабораторної прецизійності, більш ніж на максимально допустиму невизначеність результатів аналізу з Табл. 4.1:

$$|Z_{i, Transfer} - \overline{Z_{intra}}| \cdot 100\% \leq \max \Delta_{As} . \quad (4.28)$$

Типовий приклад проведення валідації методики кількісного визначення у варіанті методу стандарту наведений у *Прикладі 1*.