

**Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
ПРИВОЛЖСКИЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ
Министерства здравоохранения Российской Федерации**

Кафедра фармацевтической химии и фармакогнозии

**Валидация методики количественного определения содержания
активной фармацевтической субстанции (АФС) при оценке
растворения таблеток (ОФС.1.4.2.0014.15 Растворение для
твердых дозированных лекарственных форм)**

Учебное пособие

Нижний Новгород
Издательство ПИМУ, 2020

УДК

ББК

Ф-

СОСТАВИТЕЛИ: Мельникова Н.Б., д.х.н., профессор, Малыгина Д.С., к.фарм.н. Воробьева О.А., к.фарм.н., Новопольцев Д.Е., Пантелеев Д.А., к.х.н.

Рецензенты:

Успенская Елена Валерьевна — профессор кафедры фармацевтической и токсикологической химии Медицинского института ФГАОУ ВО РУДН, д.фарм.н., доцент

Кононова Светлана Владимировна — заведующий кафедрой управления и экономики фармации и фармацевтической технологии ФГБОУ ВО ПИМУ Минздрава России, д.фарм.н., профессор

Ф- Валидация методики количественного определения содержания активной фармацевтической субстанции (АФС) при оценке растворения таблеток (ОФС.1.4.2.0014.15 Растворение для твердых дозированных лекарственных форм): учебное пособие / Мельникова Н.Б., Малыгина Д.С., Воробьева О.А., Новопольцев Д.Е., Пантелеев Д.А. – Нижний Новгород: Изд-во «ПИМУ», 2020. – 53 с.

Методические указания к практическим занятиям по фармацевтической химии, составлено для студентов фармацевтического факультета в соответствии ФГОС ВО по направлению подготовки 33.05.01 «Фармация» и рабочей программой по фармацевтической химии. В предлагаемом пособии в краткой форме изложен материал, включающий валидационные показатели спектрофотометрического метода анализа при оценке растворения таблеток (согласно ОФС.1.4.2.0014.15 Растворение для твердых дозированных лекарственных форм).

Для более успешного освоения материала, пособие содержит вопросы и тестовые задания для самостоятельной работы.

Утверждено и рекомендовано к изданию цикловой методической комиссией по фармацевтическим дисциплинам (протокол № _ от « » _____ 2020 г.) и центральным методическим советом ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России (протокол № _ от « » _____ 2020 г.)

© ФГБОУ ВО ПИМУ Минздрава
России, 2020

ISBN

СОДЕРЖАНИЕ

У

ВВЕДЕНИЕ	4
ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ	6
Тесты для проверки теоретических знаний.....	9
ПРИБОРЫ И ОБОРУДОВАНИЕ	15
ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ	17
ОПРЕДЕЛЕНИЕ РАСТВОРЕНИЯ ТВЕРДЫХ ЛФ	17
1. Построение калибровочного графика зависимости $A = f(C, \%)$ для стандартных растворов АФС (на примере 5-нитрофурала и дротаверина гидрохлорида)	17
1.1. Приготовление стандартных растворов АФС	17
1.2. Измерение поглощения А стандартных растворов на спектрофотометре и построение графика $A = f(C, \%)$	18
2. Оценка валидационных показателей при определении поглощения стандартных растворов АФС	19
2.1. Расчет относительного стандартного отклонения как критерия оценки показателей Специфичность и Прецизионность	19
2.2. Оценка показателя Линейность	20
2.3. Оценка показателей Предел количественного определения и Предел обнаружения	21
3. Испытание растворения таблеток (на примере таблеток Фурацилина, Ношпы и Спазмонета)	22
3.1. Условия проведения испытаний	22
3.2. Расчет концентрации АФС, перешедшей в раствор при исследовании растворения таблеток	24
3.3. Оценка робастности в методике количественного определения содержания АФС в испытании на Растворение таблеток	25
3.4. Оценка показателя Специфичности	26
4. Заключение по выполненной практической части работы	27
Список рекомендуемой литературы	28
ПРИЛОЖЕНИЕ 1	29
ПРИЛОЖЕНИЕ 2	31
ПРИЛОЖЕНИЕ 3	33
ПРИЛОЖЕНИЕ 4	45
ПРИЛОЖЕНИЕ 5	53

ВВЕДЕНИЕ

Испытание «Растворение» предназначено для количественного определения активной фармацевтической субстанции (АФС), высвобождающейся в водную среду из твердой лекарственной формы.

Методика оценки растворения, заключающаяся в количественном определении АФС, должна быть документально подтверждена (**валидирована**) с высокой степенью надежности, соответствующей заранее установленным спецификациям и показателям качества для данного АФС.

Для аналитической методики спектрофотометрического количественного определения, согласно Руководству ICH Q2A, необходимо определить показатели валидации: специфичность, прецизионность (повторяемость и воспроизводимость), правильность, предел обнаружения, предел количественного определения, линейность, диапазон применимости. В случае подтверждения воспроизводимости методики оценка промежуточной прецизионности не требуется. Недостаточная специфичность аналитической методики может быть компенсирована другими вспомогательными аналитическими методиками.

Цель занятия: Провести валидацию спектрофотометрического определения АФС для оценки растворения ЛФ в различных средах.

Задачи работы:

Оценка валидационных показателей *спектрофотометрического количественного определения АФС*: Специфичность, Прецизионность, Линейность, Предел обнаружения и предел количественного определения, Робастность.

Необходимо знать:

- Основные валидационные показатели.
- Особенности валидационных показателей при СФМ анализе.
- Особенности количественного определения АФС при проведении испытания на растворение твердых лекарственных форм.

Вопросы для самопроверки:

1. Перечислить нормативную документацию, где указаны параметры валидации.
2. Указать особенности оценки показателя Специфичность (Селективность) для спектрофотометрического метода (СФМ) анализа. Отличие от ВЭЖХ, ГЖХ и титриметрического метода анализа.
3. Указать особенности оценки показателя Пригодность системы для СФМ анализа.
4. Какие условия и факторы нужно учитывать при оценке Робастности при СФМ анализе?
5. Какие показатели Прецизионности можно определять при СФМ анализе? Что собой представляет показатель Воспроизводимость?
6. Какие валидационные показатели характеризуются величиной стандартного отклонения (SD) и относительного стандартного отклонения (RSD,%)?
7. Какие показатели необходимо привлекать при оценке валидационного показателя Линейность и аналитическая область методики?
8. Как определяются предел обнаружения и предел количественного определения при СФМ анализе?

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Валидационные показатели спектрофотометрического метода анализа

Специфичность, селективность (Specificity, иногда — Selectivity) аналитического метода определяется его способностью достоверно определять ЛВ в присутствии примесей, продуктов деградации и вспомогательных веществ. Специфичность определяется с целью проверки подлинности, испытания на чистоту, количественного определения. Характеризуется величиной RSD, %.

Пригодность системы (System suitability) — проверка (тесты) единства методики анализа, используемых растворов, оборудования и робастности.

Робастность (Robustness) представляет собой оценку особенности и специфики проведения анализа и стандартизации условий анализа (влияние pH среды, температуры проведения анализа, скорости перемешивания и других факторов).

Робастность оценивают по отклонению от заявляемых параметров проведения анализа и стандартизации. Показатели робастности определяются методикой анализа (ВЭЖХ, ГЖХ, СФМ).

Прецизионность (Precision) – степень близости друг к другу независимых результатов измерений, полученных в конкретных установленных условиях. Эта характеристика зависит только от случайных факторов и не связана с истинным или условно истинным значением измеряемой величины. Мера прецизионности обычно вычисляется как стандартное (среднеквадратическое) отклонение результатов измерений, выполненных в определенных условиях. Количественные значения мер прецизионности существенно зависят от заданных условий. Экстремальные показатели прецизионности -

повторяемость, сходимость (repeatability) и воспроизводимость (reproducibility). Характеризуется величиной RSD,%.

Точность (Accuracy) — мера сходимости результатов при многократном повторении аналитической процедуры.

Правильность характеризует степень соответствия между известным истинным значением (или справочной величиной) и значением, полученным по данной методике. Характеризуется величинами \bar{x} - μ и RSD,%.

Линейность и аналитическая область методики (Linearity and Range) устанавливается на основании результатов испытаний, которые пропорциональны концентрации анализируемого вещества в образце в пределах аналитической методики. Линейность результатов может быть представлена графически в виде зависимости аналитических сигналов от концентрации вещества. Характеризуется величиной R^2 и уравнением прямой.

Предел обнаружения (Limit of detection) характеризует минимальное содержание ЛВ в образце, которое может быть обнаружено данным методом, обычно выражается как концентрация ЛВ (например, в % или долях на миллион — ppm) в образце и используется главным образом для испытаний на чистоту.

Предел количественного определения (Quantitation limit) — это минимальное количество ЛВ, которое может быть определено с приемлемой правильностью и прецизионностью. Это характеристика определения малых концентраций веществ в образце (например, примесей или продуктов деградации, в %, ppm). Устанавливается путем анализа образца с известной концентрацией определяемого вещества и определением его минимального количества.

Таблица 1

Валидация спектрофотометрической методики количественного определения 5-нитрофураля спектрофотометрическим методом

Валидационный показатель		Определяют:	Примечания
Специфичность	+	способность однозначно оценивать АФС в присутствии примесей	В UV-vis спектре А, λ и $E_{1\text{см}}^{1\%}$ для АФС совпадают только со стандартом в анализируемых условиях
Прецизионность: - Повторяемость (сходимость), внутрилабораторная прецизионность - Воспроизводимость, межлабораторная прецизионность	+ +	$E_{\text{случ.}}$ 6 образцов, близких к номинальному в 1 лаборатории в разные дни и разные аналитики $E_{\text{случ.}} + E_{\text{сист.}}$	1) станд. откл. (s), 2) коэф. вариации, 3) отн. станд. откл. (%RSD или S%) 4) доверительный интервал. RSD не более 2%
Правильность	+	На трех уровнях 50%, 100% и 150%, всего 9 опытов ^a	Открываемость (recovery), % $100\% - (\bar{x} - \mu)\%$
Предел обнаружения, ПО (LD) ^b	-	ПКО/3,3	Концентрация исследуемого раствора, в 3,3 раза меньшая, чем ПКО.
Предел количественного определения, ПКО ^b (LQ)	+	C, % при A = 0,05	Концентрация исследуемого раствора, при которой A составляет 0,05.
Линейность	+	Коэффициент регрессии, угол наклона, R ² не менее 0,99	для зависимости A = f(C)
Диапазон применимости	+	для показателя «Растворение» — 20% — через 1 ч и до 90% — через 24 ч	валидированная аналитическая область должна охватывать интервал 0 — 110% от НД);
Робастность	+	pH раствора, t°C, скорость перемешивания	

Примечания:

«-» - указывает на то, что эта характеристика обычно не оценивается.

«+» - указывает на то, что эта характеристика обычно оценивается.

^a Метод добавки или модельных смесей

^b Обычно выражают в мкг/мл или мг/мл

Тесты для проверки теоретических знаний

1. ПОКАЗАТЕЛЬ СООТВЕТСТВИЯ СЫРЬЯ/ПРЕПАРАТА ТОМУ НАИМЕНОВАНИЮ, ПОД КОТОРЫМ ОНО ПОСТУПИЛО НА АНАЛИЗ – ЭТО

- 1) подлинность
- 2) идентичность
- 3) специфичность
- 4) правильность

2. МЕТОДИКИ ПРОВЕРКИ ПОДЛИННОСТИ ПОДВЕРГАЮТСЯ ВАЛИДАЦИИ ПРИ НЕОБХОДИМОСТИ ПОДТВЕРДИТЬ ИХ

- 1) линейность
- 2) правильность
- 3) специфичность
- 4) сходимость

3. РЕВАЛИДАЦИЮ (ПОВТОРНУЮ ВАЛИДАЦИЮ) МЕТОДИК НЕ ПРОВОДЯТ ПРИ ИЗМЕНЕНИИ

- 1) условий регистрации ЛС
- 2) технологии получения объекта анализа
- 3) состава лекарственного средства (объекта анализа)
- 4) ранее утвержденной методики анализа

4. СПОСОБНОСТЬ АНАЛИТИЧЕСКОЙ МЕТОДИКИ ОДНОЗНАЧНО ОЦЕНИВАТЬ ОПРЕДЕЛЯЕМОЕ ВЕЩЕСТВО В ПРИСУТСТВИИ СОПУТСТВУЮЩИХ КОМПОНЕНТОВ - ЭТО

- 1) воспроизводимость

- 2) правильность
- 3) сходимость
- 4) специфичность

5. НАИМЕНЬШЕЕ КОЛИЧЕСТВО (КОНЦЕНТРАЦИЯ) ОПРЕДЕЛЯЕМОГО ВЕЩЕСТВА В ОБРАЗЦЕ, КОТОРОЕ МОЖЕТ БЫТЬ ОБНАРУЖЕНО (ИЛИ ПРИБЛИЖЕННО ОЦЕНЕНО) С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ВАЛИДИРУЕМОЙ МЕТОДИКИ – ЭТО

- 1) предел количественного определения
- 2) предел обнаружения
- 3) предел аналитической методики
- 4) предел валидации

6. НАИМЕНЬШЕЕ КОЛИЧЕСТВО (КОНЦЕНТРАЦИЯ) ВЕЩЕСТВА В ОБРАЗЦЕ, КОТОРОЕ МОЖЕТ БЫТЬ КОЛИЧЕСТВЕННО ОЦЕНЕНО С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ВАЛИДИРУЕМОЙ МЕТОДИКИ С ТРЕБУЕМОЙ ПРАВИЛЬНОСТЬЮ И ВНУТРИЛАБОРАТОРНОЙ (ПРОМЕЖУТОЧНОЙ) ПРЕЦИЗИОННОСТЬЮ – ЭТО

- 1) предел количественного определения
- 2) предел обнаружения
- 3) предел аналитической методики
- 4) предел валидации

7. ИНТЕРВАЛ МЕЖДУ ВЕРХНИМ И НИЖНИМ ЗНАЧЕНИЕМ АНАЛИТИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК ОПРЕДЕЛЯЕМОГО КОМПОНЕНТА В ОБЪЕКТЕ АНАЛИЗА (ЕГО КОЛИЧЕСТВА, КОНЦЕНТРАЦИИ, АКТИВНОСТИ И Т. П.) – ЭТО

- 1) предел обнаружения
- 2) предел количественного определения
- 3) аналитическая область методики

- 4) валидационный диапазон

8. МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДОЛЖНЫ БЫТЬ ПРИМЕНИМЫ В ИНТЕРВАЛЕ (ОТ НОМИНАЛЬНОГО ЗНАЧЕНИЯ ОПРЕДЕЛЯЕМОЙ АНАЛИТИЧЕСКОЙ ХАРАКТЕРИСТИКИ)

- 1) от 50 до 150%
- 2) от 70 до 130%
- 3) от 80 до 120 %
- 4) от 40 до 160%

9. НАЛИЧИЕ ЛИНЕЙНОЙ ЗАВИСИМОСТИ АНАЛИТИЧЕСКОГО СИГНАЛА ОТ КОНЦЕНТРАЦИИ ИЛИ КОЛИЧЕСТВА ОПРЕДЕЛЯЕМОГО ВЕЩЕСТВА В АНАЛИЗИРУЕМОЙ ПРОБЕ В ПРЕДЕЛАХ АНАЛИТИЧЕСКОЙ ОБЛАСТИ МЕТОДИКИ – ЭТО

- 1) воспроизводимость
- 2) правильность
- 3) сходимость
- 4) линейность

10. ВАЛИДИРУЕМАЯ МЕТОДИКА ПРИЗНАЕТСЯ ПРАВИЛЬНОЙ, ЕСЛИ ЗНАЧЕНИЯ, ПРИНИМАЕМЫЕ ЗА ИСТИННЫЕ, ЛЕЖАТ ВНУТРИ ДОВЕРИТЕЛЬНЫХ ИНТЕРВАЛОВ СООТВЕТСТВУЮЩИХ СРЕДНИХ РЕЗУЛЬТАТОВ АНАЛИЗОВ

- 1) полученных экспериментально по данной методике
- 2) полученных для стандартных образцов
- 3) указанных в фармакопейной статье
- 4) указанных в государственном стандарте

11. ДЛЯ ОЦЕНКИ ПРАВИЛЬНОСТИ МЕТОДИК КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ НЕ ПРИМЕНИМ ПОДХОД

1) анализ с использованием валидируемой методики стандартных образцов или модельных смесей с известным содержанием (концентрацией) определяемого вещества;

2) рассмотрение результатов изучения сходимости валидируемой методики

3) сравнение результатов, полученных с использованием валидируемой методики и образцовой методики, правильность которой ранее установлена;

4) рассмотрение результатов изучения линейности валидируемой методики

12. ВАЛИДАЦИОННЫЙ ПОКАЗАТЕЛЬ, КОТОРЫЙ ХАРАКТЕРИЗУЕТСЯ РАССЕЯНИЕМ РЕЗУЛЬТАТОВ, ПОЛУЧАЕМЫХ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДИКИ, ОТНОСИТЕЛЬНО ВЕЛИЧИНЫ СРЕДНЕГО РЕЗУЛЬТАТА, НАЗЫВАЕТСЯ

- 1) специфичность
- 2) правильность
- 3) прецизионность
- 4) линейность

13. ПРЕЦИЗИОННОСТЬ ДОЛЖНА ИССЛЕДОВАТЬСЯ НА ОДНОРОДНЫХ ОБРАЗЦАХ И МОЖЕТ ОЦЕНИВАТЬСЯ В ТРЕХ ВАРИАНТАХ, ИСКЛЮЧАЯ

- 1) повторяемость (сходимость)
- 2) внутрилабораторная (промежуточная) прецизионность
- 3) межлабораторная прецизионность (воспроизводимость)
- 4) специфичность

14. ПОВТОРЯЕМОСТЬ АНАЛИТИЧЕСКОЙ МЕТОДИКИ ОЦЕНИВАЮТ ПО НЕЗАВИСИМЫМ РЕЗУЛЬТАТАМ, ПОЛУЧЕННЫМ

- 1) в разных регламентированных условиях в одной лаборатории
- 2) в одинаковых регламентированных условиях в одной лаборатории
- 3) в разных регламентированных условиях в разных лабораториях
- 4) в одинаковых регламентированных условиях в разных лабораториях

15. ПРОМЕЖУТОЧНАЯ ПРЕЦИЗИОННОСТЬ ВАЛИДИРУЕМОЙ МЕТОДИКИ НЕ МОЖЕТ ОЦЕНИВАТЬСЯ

- 1) разными исполнителями в условиях работы разных лабораторий
- 2) в разные дни в условиях работы одной лаборатории
- 3) разными исполнителями в условиях работы одной лаборатории
- 4) на разном оборудовании в условиях работы одной лаборатории

16. ПОДТВЕРЖДЕНИЕ ТОГО, ЧТО МЕТОДИКА ПОЗВОЛЯЕТ ИДЕНТИФИЦИРОВАТЬ ИМЕННО ОПРЕДЕЛЯЕМОЕ ВЕЩЕСТВО – ЭТО

- 1) специфичность
- 2) правильность
- 3) открываемость
- 4) идентификация

17. СООТНОШЕНИЕ МЕЖДУ ПОЛУЧЕННЫМ СРЕДНИМ И ИСТИННЫМ/ОПОРНЫМ ЗНАЧЕНИЯМИ С УЧЕТОМ СООТВЕТСТВУЮЩИХ ДОВЕРИТЕЛЬНЫХ ИНТЕРВАЛОВ – ЭТО

- 1) сходимость
- 2) открываемость
- 3) правильность
- 4) воспроизводимость

18. СПОСОБНОСТЬ АНАЛИТИЧЕСКОЙ МЕТОДИКИ БЫТЬ УСТОЙЧИВОЙ К ВЛИЯНИЮ НЕБОЛЬШИХ ЗАДАВАЕМЫХ ИЗМЕНЕНИЙ

В УСЛОВИЯХ ВЫПОЛНЕНИЯ ИСПЫТАНИЯ, КОТОРАЯ УКАЗЫВАЕТ НА ЕЕ НАДЕЖНОСТЬ ПРИ ОБЫЧНОМ (СТАНДАРТНОМ) ИСПОЛЬЗОВАНИИ – ЭТО

- 1) специфичность
- 2) робастность
- 3) правильность
- 4) сходимость

19. СООТНОШЕНИЕ СИГНАЛ/ШУМ ДЛЯ УСТАНОВЛЕНИЯ ПРЕДЕЛА КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДОЛЖНО БЫТЬ

- 1) 10:1
- 2) 7:1
- 3) 5:1
- 4) 3:1

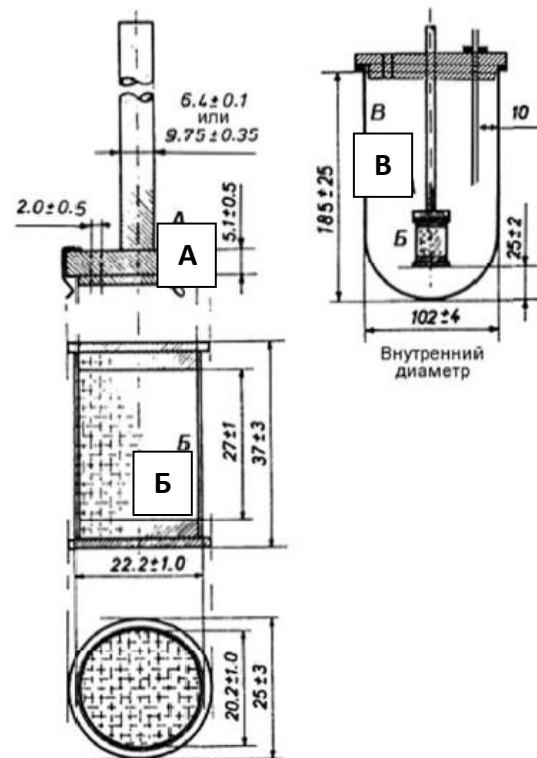
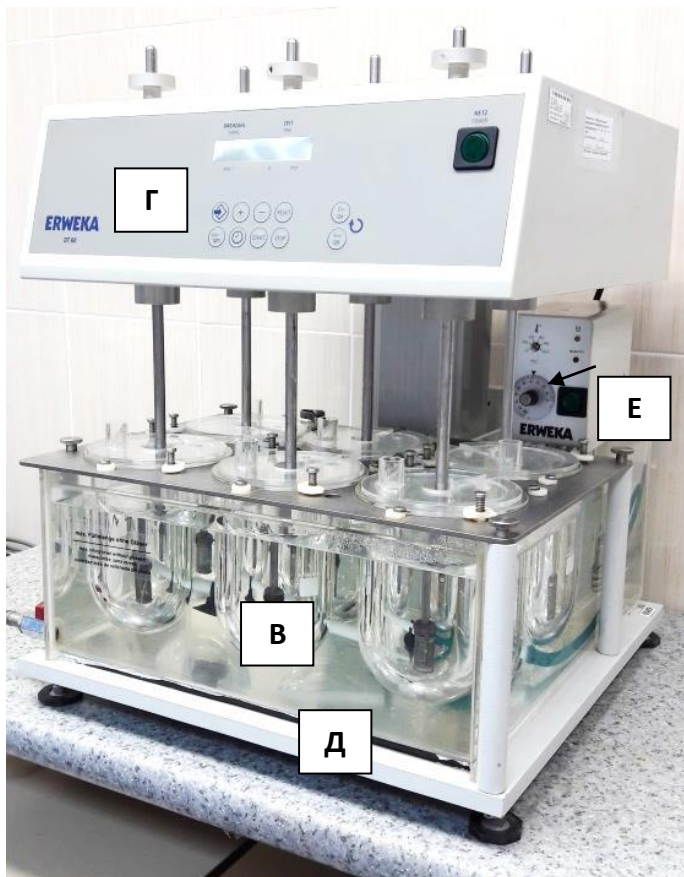
20. СООТНОШЕНИЕ СИГНАЛ/ШУМ ДЛЯ УСТАНОВЛЕНИЯ ПРЕДЕЛА ОБНАРУЖЕНИЯ ДОЛЖНО БЫТЬ

- 1) 5:1
- 2) 7:1
- 3) 10:1
- 4) 3:1

ПРИБОРЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

Приборы:

1. Фотоэлектрокалориметр или спектрофотометр;
2. УЗ-ванна и термостат;
3. Установка для определения растворимости твердых лекарственных форм Erweka DT 60 (Рис. 1).



Перемешивающий элемент:

А – вертикальный вал, к нижней части которого прикреплена цилиндрическая корзинка (Б).

В — сосуд для растворения с полусферическим дном (1000 мл);

Г — двигатель с регулятором скорости, поддерживающим скорость вращения корзинки;

Д – термостат.

Е – реле термостата.

Рис. 1 – Аппарат Erweka DT 60, тип «Вращающаяся корзинка»:

а) общий вид прибора; б) схема перемешивающего элемента и сосуда для растворения (*Размеры указаны в мм*).

Посуда:

Мерные колбы объемом 25, 50, 100 мл

Пипетки объемом 5, 10 мл

Объекты исследования:

Таблетки различных АФС.

Реактивы:

Активные фармацевтические субстанции;

Дистиллированная вода, 0,1М раствор HCl;

Буферный раствор рН 7,4. Лимонную кислоту (9,6 г) помещают в мерную колбу вместимостью 1 л, растворяют в 800 мл воды и доводят значение рН раствора 25% концентрированным раствором аммиака до $7,4 \pm 0,05$. Доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

Буферный раствор рН 4,0. Лимонную кислоту (9,6 г) помещают в мерную колбу вместимостью 1 л, растворяют в 800 мл воды и доводят значение рН раствора 25 % концентрированным раствором аммиака до $4,0 \pm 0,05$. Доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

ОПРЕДЕЛЕНИЕ РАСТВОРЕНИЯ ТВЕРДЫХ ЛФ

1. Построение калибровочного графика зависимости $A = f(C, \%)$ для стандартных растворов АФС (на примере 5-нитрофурала и дротаверина гидрохлорида).

1.1. Приготовление стандартных растворов АФС

Приготовление стандартных растворов 5-нитрофурала

Базовый стандартный раствор. Точную навеску стандартного образца 5-нитрофурала для получения 0,01% раствора (около 10 мг) помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 50 мл растворителя, выдерживают на водяной бане при 37°C и при необходимости на ультразвуковой бане до полного растворения и доводят объем раствора тем же растворителем до метки.

Стандартные растворы: 0,5 мл, 1,0 мл, 1,5 мл и 2 мл стандартного базового раствора помещают в мерные колбы вместимостью 25 мл и доводят объем раствора средой растворения до метки, получая растворы 5-нитрофурала с концентрацией 0,0002%, 0,0004%, 0,0006% и 0,0008%, соответственно.

Приготовление стандартных растворов дротаверина гидрохлорида

Базовый стандартный раствор. Точную навеску стандартного образца дротаверина гидрохлорида для получения 0,02% раствора (около 20 мг) помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 50 мл растворителя, выдерживают на водяной бане при 37°C и при необходимости на ультразвуковой бане до полного растворения и доводят объем раствора тем же растворителем до метки.

Стандартные растворы: 2,5 мл, 5,0 мл, 7,5 мл и 10,0 мл базового стандартного раствора помещают в мерные колбы вместимостью 50 мл и доводят объем раствора средой растворения до метки, получая растворы дротаверина гидрохлорида с концентрацией 0,001%, 0,002%, 0,003% и 0,004%, соответственно.

Концентрация базового и других стандартных растворов для других АФС зависит от природы субстанции.

1.2. Измерение поглощения А стандартных растворов на спектрофотометре и построение графика $A = f(C, \%)$

Измеряют поглощение А стандартных растворов на фотоэлектрокалориметре или на спектрофотометре при максимуме поглощения при указанной длине волны (пример в *Таблице 2*) в кювете с толщиной слоя 10 мм. Раствор сравнения – среда растворения (указано преподавателем).

Таблица 2

Условия приготовления и измерения поглощения стандартных растворов:

Вариант	АФС	Среда растворения	λ_{\max}
1	5-нитрофурал	H ₂ O	375
2	5-нитрофурал	0,1М раствор HCl	375
3	5-нитрофурал	Буферный раствор с рН 7,4	375
4	5-нитрофурал	Буферный раствор с рН 4,0	375
5	Дротаверина гидрохлорид	H ₂ O	354
6	Дротаверина гидрохлорид	0,1М раствор HCl	354
7	Дротаверина гидрохлорид	Буферный раствор с рН 4,0	354

Анализируют растворы каждой концентрации **при трехкратном повторе**. Результаты вносят в таблицу 3.

Таблица 3

Результаты измерения поглощения A калибровочных растворов

№	$C, \%$	A_1	A_2	A_3
1				
2				
3				
4				

По полученным данным строят график зависимости $A = f(C, \%)$ на миллиметровой бумаге и на компьютере.

2. Оценка валидационных показателей при определении поглощения стандартных растворов АФС

Показатели Специфичность и Прецизионность определяет стандартное отклонение и относительное стандартное отклонение. Показатель Линейность, Диапазон применения, Предел обнаружения и Предел количественного определения можно определить по графическим зависимостям.

2.1. Расчет относительного стандартного отклонения как критерия оценки показателей Специфичность и Прецизионность.

По результатам измерения поглощения стандартных растворов для каждой концентрации рассчитывают среднее значение поглощения:

$$A_{\text{ср}} = \frac{A_1 + A_2 + A_3}{3} \quad (1)$$

После этого находят значение стандартного отклонения:

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (A_i - A_{\text{ср}})^2}{n-1}} \quad (2)$$

Находят относительное стандартное отклонение отдельного результата:

$$RSD, \% = \frac{SD}{A_{cp}} \cdot 100\% \quad (3)$$

Полученные данные вносят в таблицу 4.

Таблица 4

Результаты расчета относительного стандартного отклонения величин поглощения для стандартных растворов АФС

№	С, %	A _{cp}	SD	RSD, %
1				
2				
3				
4				

Необходимо, чтобы стандартное отклонение отдельного результата не превышало 10,0% для показателя **Специфичность** и 2,0% для показателя **Прецизионность**.

2.2. Оценка показателя **Линейность**

Строят график зависимости $A_{cp} = f(C, \%)$ на миллиметровой бумаге и в программе Excel.

На миллиметровой бумаге через нанесенные точки и точку начала координат проводят линию тренда и определяют тангенс угла наклона прямой (необходимо разделить численную величину длины противолежащего катета на численную величину длины прилежащего в соответствующих единицах измерения).

В программе Excel строят линию тренда, пересекающуюся с координатами (0,0), выводят уравнение прямой $A = \text{tg}\alpha \cdot C, \%$ и величину достоверности аппроксимации (R^2).

Величина R^2 должна быть больше или равна 0,99 чтобы соответствовать показателю **Линейность**.

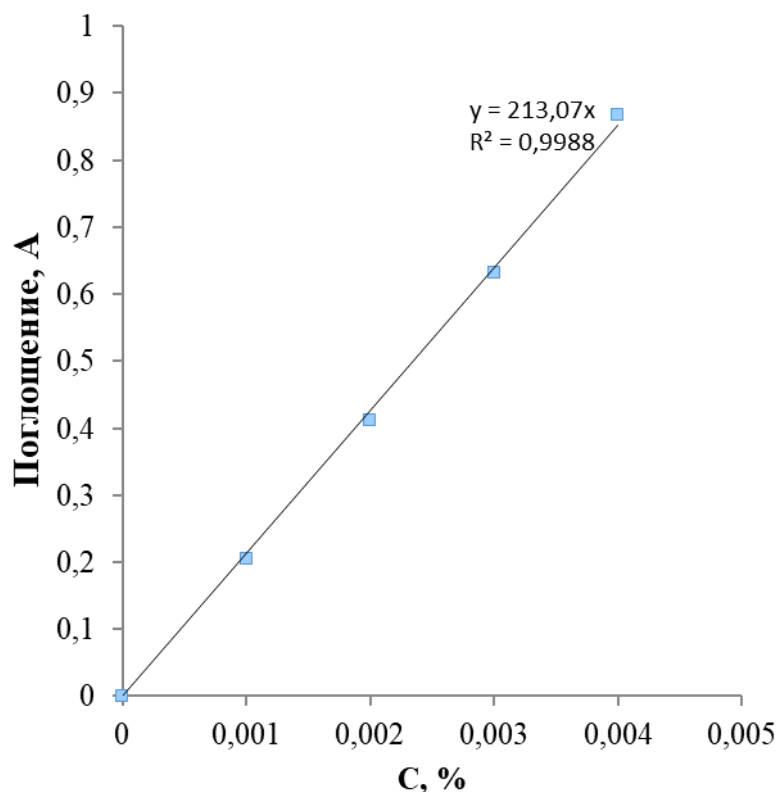


Рис. 2 – Пример графика зависимости $A_{cp} = f(C, \%)$, построенного в программе Excel

2.3. Оценка показателей **Предел количественного определения** и **Предел обнаружения**.

В спектрофотометрическом методе анализа **пределом количественного определения (ПКО)** является концентрация АФС, при которой поглощение раствора составляет 0,05. По уравнению калибровочной прямой рассчитывают величину ПКО.

Величина **предела обнаружения (ПО)** в 3,3 раза меньше величины предела количественного обнаружения:

$$ПО = ПКО / 3,3$$

3. Испытание растворения таблеток (на примере таблеток Фурацилина, Ношпы и Спазмонета).

3.1. Условия проведения испытаний

3.1.1. Таблетки Фурацилин

Таблетки помещают в установку для растворения (Erweka DT 60, тип – вращающаяся корзинка. Приложение 1) в предварительно подогретую среду для растворения (37°C) объемом 900 мл при скорости вращения корзинки 200 об./мин (Фурацилин). Через 10, 20, 30, 40 и 50 мин после начала анализа пипеткой отбирают пробу раствора (5 мл), помещают в мерную колбу объемом 25 мл, доводят средой растворения до метки.

Измеряют поглощение каждого раствора на фотоэлектрокалориметре при длине волны 375 нм. Раствор сравнения – среда растворения.

Исследование проводят параллельно для трех таблеток.

3.1.2. Таблетки Ношпа и Спазмонет

Таблетки помещают в установку для растворения (Erweka DT 60, тип – вращающаяся корзинка. Приложение 1) в предварительно подогретую среду для растворения (37°C) объемом 900 мл при скорости вращения корзинки 50 об./мин. Через 5, 10, 15, 20 и 30 мин после начала анализа пипеткой отбирают пробу раствора (5 мл).

Измеряют поглощение каждого раствора на фотоэлектрокалориметре при длине волны 354 нм. Раствор сравнения – среда растворения.

Исследование проводят параллельно для трех таблеток.

Результаты измерения поглощения растворов вносят в таблицу 5.

Рассчитывают среднее значение поглощения, величины SD и RSD для растворов, отобранных в разные промежутки времени:

Таблица 5

Результаты измерения поглощения A калибровочных растворов

№	τ , мин	Поглощение, A			$A_{\text{ср}}$	SD	RSD, %
		Таблетка 1	Таблетка 2	Таблетка 3			
1							
2							
3							
4							
5							

Строят график растворения во времени $A_{\text{ср}} = f(\tau, \text{мин})$ на миллиметровой бумаге и в программе Excel.

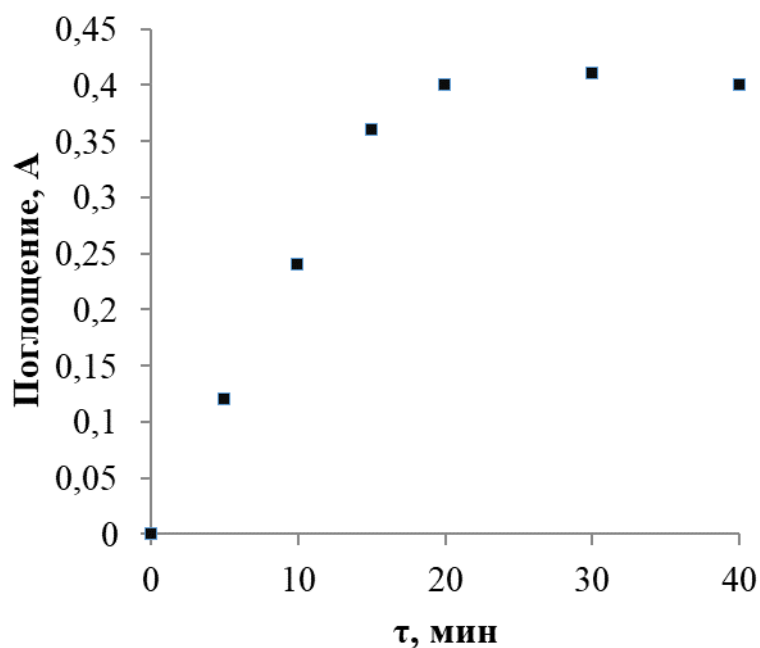


Рис. 3 – Пример графика зависимости $A_{\text{ср}} = f(\tau, \text{мин})$, построенного в программе Excel

3.2. Расчет концентрации АФС, перешедшей в раствор при исследовании растворения таблеток.

С помощью калибровочного графика и его уравнения ($C, \% = A/tg_{\alpha}$) определяют концентрацию исследуемых растворов **через 30 мин** после начала растворения таблеток.

Пересчитывают полученную концентрацию на количество АФС, перешедшее в раствор, в процентах (X), по формуле:

$$X = \frac{C, \% \cdot 900 \text{мл} \cdot V_{\text{кол}} \cdot 100\%}{100 \text{мл} \cdot L \cdot V_{\text{ал}}} = \frac{C, \% \cdot 9 \cdot V_{\text{кол}} \cdot 100\%}{L \cdot V_{\text{ал}}} \quad (4)$$

- Где: $C, \%$ – концентрация АФС в исследуемом образце, %;
- 900 – объем исследуемого растворителя в сосуде для растворения;
- 100 – фактор пересчета процентной концентрации в массу АФС;
- L – заявленное количество АФС в одной таблетке, г;
- $V_{\text{кол}}$ – объем колбы (в случае разбавления исследуемого раствора перед определением поглощения);
- $V_{\text{ал}}$ – объем аликвоты (в случае разбавления исследуемого раствора перед определением поглощения).

Полученные результаты оформляют в виде таблицы 6:

Таблица 6

Расчета растворения ЛФ с АФС

Таблетка	$A_{30 \text{ мин}}$	$C, \%$	$X, \%$
1			
2			
3			

Через 30 мин в раствор должно перейти не менее 75 % (Q) АФС.

3.3. Оценка робастности в методике количественного определения содержания АФС в испытании на Растворение таблеток.

Необходимо сопоставить полученные результаты с результатами других групп, исследовавших растворение таких же таблеток в средах с другими значениями рН следующим показателям:

1. Изменение поглощения A_{\max} раствора после полного растворения таблетки А;
2. Изменение зависимости времени растворения таблетки $\tau_{\text{раств}}$ от среды (высвобождение 75%, 100% АФС);
3. Изменение зависимости времени растворения таблетки $\tau_{\text{раств}}$ от лекарственной формы (высвобождение 75%, 100% АФС).

Время растворения 75% и 100% АФС оценивают по графику зависимости $A_{\text{cp}} = f(\tau, \text{мин})$:

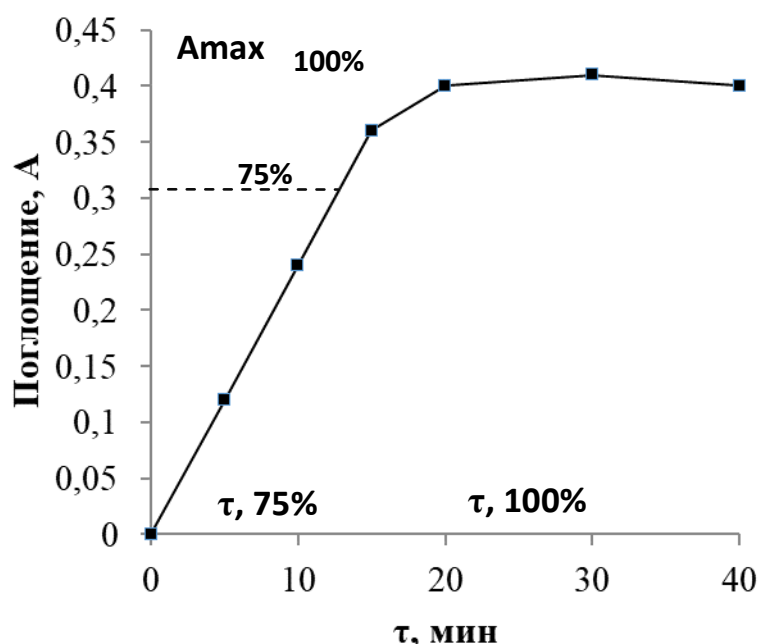


Рис. 4 – Пример определения времени растворения 75% и 100% АФС по графику зависимости $A_{\text{cp}} = f(\tau, \text{мин})$

Данные, полученные в ходе исследования растворения таблеток, и данные, полученные для других сред растворения и других лекарственных форм (взять результаты у других групп), вносят в таблицу 7:

Таблица 7

Данные растворения таблеток АФС в различных условиях

Среда растворения	A_{\max}	$\tau_{\text{раств}}$		$\tau_{\text{раств}}$ Другая ЛФ*	
		75%	100%	75%	100%
0,1 М НСІ					
рН 4,0					
Н ₂ О					
рН 7,4**					

Примечания:

*только для таблеток Ношпа и Спазмолет

**только для таблеток Фурацилин

Необходимо сделать выводы о влиянии изменения условий проведения спектрофотометрического количественного анализа на его результаты.

3.4. Оценка показателя Специфичности

Для оценки специфичности СФМ анализа кроме определения величины RSD,% изучают спектральные свойства растворов плацебо (лекарственной формы со всеми вспомогательными веществами, но без действующего вещества) в одной и той же концентрации.

Необходимо заполнить таблицу 8 и сделать выводы о специфичности СФМ анализа таблеток АФС (значения поглощения растворов плацебо указываются преподавателем).

Таблица 8

Оценка специфичности спектрофотометрического метода анализа раствора лекарственной формы АФС с применением растворов плацебо.

Образец	Длина волны	Поглощение, А
Среда (холостой опыт)		
Плацебо		
Стандарт		
Образец		
Плацебо и образец		

4. Заключение по выполненной практической части работы.

Заполняется самостоятельно студентом в соответствии с задачами, поставленными в работе.

Список рекомендуемой литературы

Основная литература:

1. Государственная фармакопея Российской Федерации / МЗ РФ. – XIII изд.
2. Государственная фармакопея Российской Федерации / МЗ РФ. – XIV изд.
3. Государственная Фармакопея Российской Федерации / МЗ РФ. – XI изд. – вып. 1 и 2.
4. ОФС.1.4.2.0014.15. Растворение для твердых дозированных лекарственных форм.

Дополнительная литература:

1. Валидация аналитических методик для производителей лекарств: Типовое руководство предприятия по производству лекарственных средств / Под редакцией В.В. Береговых – М.: Литтерра, 2008.
2. ГОСТ Р ИСО 5725-1-2002 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений.
3. ICH harmonised tripartite guideline impurities in new drug substances Q3A(R2), 2006 [in Russian]
4. Руководство по экспертизе лекарственных средств. М.: Полиграф-плюс, 2014.

Аппарат I «Вращающаяся корзинка»

ОФС.1.4.2.0014.15 Растворение для твердых дозированных лекарственных форм

Аппарат I (Рис. П1) состоит из:

— сосуда для растворения (*B*) с полусферическим дном, изготовленного из боросиликатного стекла или другого подходящего прозрачного инертного материала. Номинальная вместимость сосуда для растворения составляет 1000 мл; высота – 185 ± 25 мм; внутренний диаметр – 102 ± 4 мм;

— двигателя с регулятором скорости, поддерживающим скорость вращения корзинки в пределах ± 4 % от скорости вращения корзинки, указанной в фармакопейной статье или нормативной документации;

– перемешивающего элемента, который состоит из вертикального вала (*A*), к нижней части которого прикреплена цилиндрическая корзинка (*B*). Ось вращения вала не должна отклоняться от вертикальной оси сосуда более чем на 2 мм. Вращение вала должно быть плавным, без существенных колебаний.

Корзинка состоит из двух частей: верхняя часть, имеющая отверстие диаметром $2,0 \pm 0,5$ мм, должна быть приварена к валу и снабжена 3 упругими зажимами или другим подходящим приспособлением, позволяющим удалять нижнюю часть корзинки для введения испытуемого лекарственного средства. Съемная часть корзинки сделана из сваренной прямым швом металлической проволочной сетки, в которой проволока диаметром 0,21-0,31 мм образует отверстия размером 0,36-0,44 мм. Сетка имеет форму цилиндра и сверху и снизу ограничена металлической оправой.

При использовании агрессивных кислых растворов может использоваться корзинка, покрытая слоем золота толщиной 2,5 мкм.

Расстояние между дном сосуда для растворения и корзиной должно составлять от 23 до 27 мм.

Для предотвращения испарения среды растворения сосуды для растворения должны закрываться крышками с центральным отверстием для прохождения оси корзинки, а также с отверстиями для термометра и отбора проб.

Для поддержания температуры среды растворения ($37 \pm 0,5$) °С аппарат должен быть оснащен водяной баней с постоянным объемом термостатируемой жидкости.

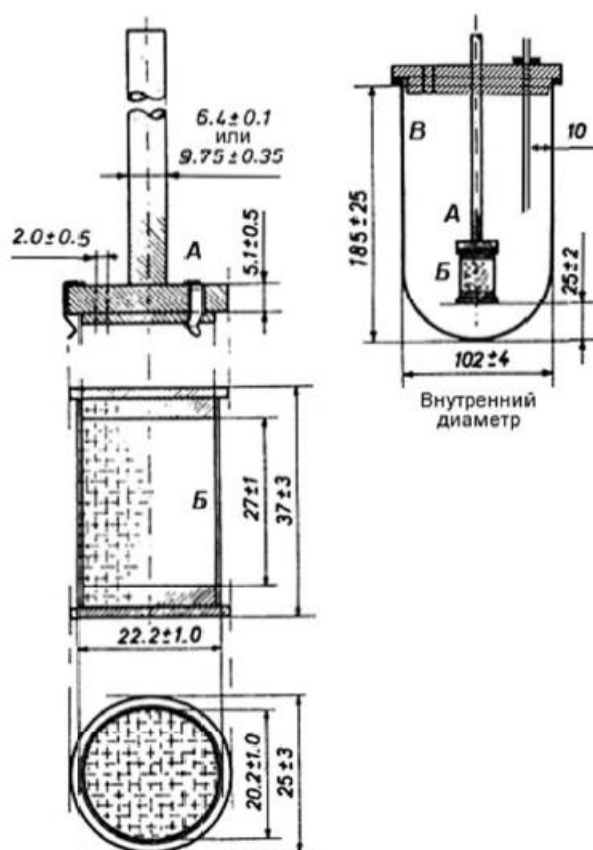


Рис. П1 – Аппарат I «Вращающаяся корзинка»

Размеры указаны в мм

ИНСТРУКЦИЯ
по работе с прибором ERWEKA DT60

Подготовительные операции

1. Установить реле термостата на нужную температуру (37°C).
2. Включить термостат и блок управления кнопками «**Power**».
3. Поднять ротор до упора.

Ротор поднимать и опускать вручную за ту часть, которая находится над блоком управления

4. В тестовые емкости (шесть стаканов с круглым дном) налить требуемые объемы растворителя, в которых будет определяться растворение образцов.


5. Нагреть воду в термостате и тестовых емкостях до требуемой температуры (*желтая лампочка на термостате перестает мигать и горит постоянно*).


6. Поместить исследуемые образцы (таблетки, капсулы и пр.) в корзины. Корзины зафиксировать креплениями на диске ротора.

Установка частоты вращения корзины

Для установки частоты вращения корзины:

1. Нажать кнопку «**min⁻¹ rpm**» на панели управления. В левой части табло замигает число с текущим значением частоты вращения корзины.

2. Кнопками  , «+» и «-» задать требуемую частоту. Кнопки «+» и «-»

увеличивают и уменьшают значение, кнопка  перемещает каретку между разрядами значения оборотов.

3. Для сохранения значения в памяти прибора нажать «**RESET**». Частота оборотов должна лежать в интервале 20-220 об/мин.


Проведение эксперимента

1. Опустить ротор с корзинами до упора вниз. Необходимо, чтобы пазы совместились.

2. Включить привод ротора кнопкой «**EIN / ON**». Ротор разгонится до числа оборотов, хранящегося в памяти.

3. Нажать кнопку «**START**». После ее нажатия начнется отсчет времени в правой части табло.

4. Во время теста можно изменить частоту оборотов. Для этого: Нажать

кнопку «**min⁻¹ rpm**». Кнопками , «+» и «-» задать требуемую частоту. «**RESET**» **не нажимать!** Через 15 сек индикатор оборотов автоматически перестает мигать.

5. Для окончания опыта нажать «**AUS / OFF**» и выключить питание на панели управления в термостате.

Валидация аналитических методик

ОФС.1.1.0012.15

Валидация аналитической методики – это экспериментальное доказательство того, что методика пригодна для решения предполагаемых задач.

Настоящая общая фармакопейная статья регламентирует характеристики аналитических методик, определяемые с целью их валидации, и соответствующие критерии пригодности валидируемых методик, предназначенных для контроля качества лекарственных средств: фармацевтических субстанций и лекарственных препаратов.

Валидации подлежат методики количественного определения, в том числе методики определения примесей и методики определения предела содержания. Методики проверки подлинности подвергаются валидации при необходимости подтвердить их специфичность.

При валидации проводится оценка аналитической методики по перечисленным ниже характеристикам, выбираемым с учетом типовых рекомендаций, приведенных в таблице:

- специфичности (specificity);
- пределу обнаружения (detection limit);
- пределу количественного определения (quantitation limit);
- аналитической области (range);
- линейности (linearity);
- правильности (trueness);
- прецизионности (precision);
- устойчивости (robustness).

Таблица 1. Характеристики методик, определяемые при валидации

Наименование характеристики	Основные типы методик				
	Испытание на подлинность	Посторонние примеси		Количественное определение	
		Количественные методики	Предел содержания	Основного действующего вещества, нормируемых компонентов	Действующего вещества в тесте «Растворение»
Специфичность**)	Да	Да	Да	Да	Да
Предел обнаружения	Нет	Нет	Да	Нет	Нет
Предел количественного определения	Нет	Да	Нет	Нет	Нет
Аналитическая область	Нет	Да	Нет	Да	Да
Линейность	Нет	Да	Нет	Да	Да
Правильность	Нет	Да	*	Да	Да
Прецизионность: – повторяемость (сходимость)	Нет	Да	Нет	Да	Да
– промежуточная (внутрилабораторная) прецизионность	Нет	Да	Нет	Да	Нет
Устойчивость	Нет	*	*	*	*

*) может определяться при необходимости; **) отсутствие специфичности одной аналитической методики может быть компенсировано использованием другой аналитической методики.

Ревалидацию (повторную валидацию) методик проводят при изменении:

- технологии получения объекта анализа;
- состава лекарственного средства (объекта анализа);
- ранее утвержденной методики анализа.

1. СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Специфичность – это способность аналитической методики однозначно оценивать определяемое вещество в присутствии сопутствующих компонентов.

Доказательство специфичности валидируемой методики обычно основывается на рассмотрении полученных с ее использованием данных анализа модельных смесей известного состава. Специфичность валидируемой методики может быть доказана также соответствующей статистической обработкой результатов анализов реальных объектов, выполненных с ее использованием и, параллельно, с использованием другой, заведомо специфичной, методики (методики, специфичность которой доказана).

1.1 Для методик испытаний на подлинность

Валидируемая методика (или совокупность методик) должна обеспечивать достоверную информацию о присутствии данного действующего вещества в субстанции или лекарственной форме при наличии в ее составе предусмотренных рецептурой компонентов, что подлежит экспериментальному подтверждению. Подлинность действующего вещества в фармацевтической субстанции или лекарственном препарате устанавливают в сравнении со стандартным образцом или по физико-химическим или химическим свойствам, не характерным для других компонентов.

1.2 Для методик количественного определения и испытания на примеси

Для валидируемой методики количественного определения и испытаний на примеси применяют одинаковые подходы – должна быть оценена ее специфичность в отношении определяемого вещества, т. е. должно быть экспериментально подтверждено, что присутствие сопутствующих компонентов не влияет непредусмотренным образом на результат анализа.

Допускается оценка специфичности валидируемой методики как путем анализа модельных смесей известного состава, содержащих определяемое вещество, так и путем сравнения результатов анализов реальных объектов, полученных одновременно с использованием валидируемой и другой, заведомо специфичной методики. Результаты соответствующих экспериментов должны быть статистически обработаны. Недостаток специфичности испытания может быть компенсирован другим (другими) дополнительным испытанием.

При валидации методик, если это целесообразно, могут использоваться образцы лекарственных средств, подвергнутые, с целью накопления в них примесей, воздействию экстремальных условий (света, температуры, влажности) или химически модифицированные любым подходящим способом.

Для хроматографических методик показывают разрешение между двумя наиболее близко элюирующимися веществами при соответствующих концентрациях.

2. ПРЕДЕЛ ОБНАРУЖЕНИЯ

Предел обнаружения – это наименьшее количество (концентрация) определяемого вещества в образце, которое может быть обнаружено (или приближенно оценено) с использованием валидируемой методики.

Предел обнаружения в случаях, указанных в таблице, обычно выражается как концентрация определяемого вещества (в % относительных или долях на миллион – ppm). В зависимости от типа методики (визуальная или инструментальная) используют разные способы определения предела обнаружения.

2.1 Для методик с визуальной оценкой результата анализа

Проводят испытания образцов с различными известными количествами (концентрациями) определяемого вещества и устанавливают минимальное значение, при котором результат анализа может быть оценен визуально. Это значение является оценкой предела обнаружения.

2.2 Для методик с инструментальной оценкой результата анализа

2.2.1 По соотношению сигнал/шум

Этот подход применим к методам, для которых наблюдается шум базовой линии. Сравнивают величины сигналов, полученных для контрольного опыта и для образцов с низкими концентрациями анализируемого вещества. Устанавливают минимальное количество (концентрацию) определяемого вещества в образце, при котором величина отношения аналитического сигнала

к уровню шумов равна 3. Найденная величина является оценкой предела обнаружения.

2.2.2 По величине стандартного отклонения сигнала и угловому коэффициенту калибровочного графика

Предел обнаружения (ПО) находят по уравнению:

$$\text{ПО} = 3,3 S/b,$$

где S – стандартное отклонение аналитического сигнала; b – коэффициент чувствительности, представляющий собой отношение аналитического сигнала к определяемой величине (тангенс угла наклона калибровочной кривой).

При наличии экспериментальных данных в широком диапазоне измеряемой величины S и b могут быть оценены методом наименьших квадратов. Для линейного калибровочного графика значение S принимают равным стандартному отклонению S_a свободного члена уравнения этого графика. Полученное значение предела обнаружения при необходимости может быть подтверждено прямым экспериментом при количествах (концентрациях) определяемого вещества, близких к найденному значению предела обнаружения. Как правило, если имеются данные о пригодности методики для надежного определения вещества в концентрациях, лежащих как выше, так и ниже нормы его содержания, установленной спецификацией, определять реальный предел обнаружения для такой методики не требуется.

3. ПРЕДЕЛ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Предел количественного определения – это наименьшее количество (концентрация) вещества в образце, которое может быть количественно оценено с использованием валидируемой методики с требуемой правильностью и внутрилабораторной (промежуточной) прецизионностью.

Предел количественного определения является необходимой валидационной характеристикой методик, используемых для оценки малых количеств (концентраций) веществ в образце и, в частности, для оценки

содержания примесей. В зависимости от типа методики используют следующие способы нахождения предела количественного определения.

3.1 Для методик с визуальной оценкой результата анализа

Проводят испытания образцов с различными известными количествами (концентрациями) анализируемого вещества и устанавливают минимальное значение, при котором результат анализа может быть получен визуально с требуемой правильностью и внутрилабораторной (промежуточной) прецизионностью.

3.2 Для методик с инструментальной оценкой результата анализа

3.2.1 По соотношению сигнал/шум

Устанавливают минимальную концентрацию определяемого вещества в образце, при которой величина отношения аналитического сигнала к уровню шума составляет около 10:1.

3.2.2 По величине стандартного отклонения сигнала и угловому коэффициенту калибровочного графика

Предел количественного определения (ПКО) рассчитывают по уравнению:

$$\text{ПКО} = 10 S/b,$$

где S – стандартное отклонение аналитического сигнала; b – коэффициент чувствительности, представляющий собой отношение аналитического сигнала к определяемой величине.

При наличии экспериментальных данных в широком диапазоне измеряемой величины S и b могут быть оценены методом наименьших квадратов. Для линейного калибровочного графика значение S принимают равным стандартному отклонению S_a свободного члена уравнения этого графика. Полученное значение предела количественного определения при необходимости может быть подтверждено прямым экспериментом при количествах (концентрациях) определяемого вещества, близких к найденному значению предела количественного определения. Если имеются данные о способности методики надежно определять анализируемое вещество в концентрации выше и ниже установленной в спецификации нормы его

содержания, определять реальное значение предела количественного определения для такой методики, как правило, не требуется.

4. АНАЛИТИЧЕСКАЯ ОБЛАСТЬ МЕТОДИКИ

Аналитическая область методики – это интервал между верхним и нижним значением аналитических характеристик определяемого компонента в объекте анализа (его количества, концентрации, активности и т. п.). В этом интервале результаты, получаемые с использованием валидируемой методики, должны иметь приемлемый уровень правильности и внутрилабораторной (промежуточной) прецизионности.

К величине аналитической области методик предъявляются следующие требования:

– методики количественного определения должны быть применимы в интервале от 80 до 120 % от номинального значения определяемой аналитической характеристики;

– методики оценки однородности дозирования должны быть применимы в интервале от 70 до 130 % от номинальной дозы;

– методики количественного определения, используемые при проведении теста «Растворение», обычно должны быть применимы в 8 пределах от 50 до 120 % от ожидаемой концентрации действующего вещества в среде растворения;

– методики испытаний на чистоту должны быть применимы в интервале от «Предела количественного определения» или «Предела обнаружения» до 120 % от допустимого содержания определяемой примеси.

Аналитическая область методики может быть установлена по диапазону экспериментальных данных, удовлетворяющих линейной модели.

5. ЛИНЕЙНОСТЬ

Линейность методики – это наличие линейной зависимости аналитического сигнала от концентрации или количества определяемого вещества в анализируемой пробе в пределах аналитической области методики.

При валидации методики ее линейность в аналитической области проверяют экспериментально измерением аналитических сигналов для не менее чем 5 проб с различными количествами или концентрациями определяемого вещества.

Экспериментальные данные обрабатывают методом наименьших квадратов с использованием линейной модели:

$$y = b \cdot x + a,$$

где x – количество или концентрация определяемого вещества; y – величина отклика; b – угловой коэффициент; a – свободный член (ОФС «Статистическая обработка результатов химического эксперимента»).

Должны быть рассчитаны и представлены величины b , a и коэффициент корреляции r . В большинстве случаев используют линейные зависимости, отвечающие условию $r = 0,99$, и только при анализе следовых количеств рассматривают линейные зависимости, для которых $r = 0,9$.

В отдельных случаях возможность линейной аппроксимации экспериментальных данных обеспечивается лишь после их математического преобразования (например, логарифмирования). Для некоторых методик анализа, в основу которых в принципе не может быть положена линейная зависимость между экспериментальными данными, определение концентрации или количества вещества проводят с использованием нелинейных калибровочных графиков. При этом график зависимости аналитического сигнала от количества или концентрации определяемого вещества может быть аппроксимирован подходящей нелинейной функцией с использованием метода наименьших квадратов, что выполнимо при наличии соответствующего валидированного программного обеспечения.

6. ПРАВИЛЬНОСТЬ

Правильность методики характеризуется отклонением среднего результата определений, выполненных с ее использованием, от значения, принимаемого за истинное. Валидируемая методика признается правильной,

если значения, принимаемые за истинные, лежат внутри доверительных интервалов соответствующих средних результатов анализов, полученных экспериментально по данной методике.

Для оценки правильности методик количественного определения применимы следующие подходы:

а) анализ с использованием валидируемой методики стандартных образцов или модельных смесей с известным содержанием (концентрацией) определяемого вещества;

б) сравнение результатов, полученных с использованием валидируемой методики и образцовой методики, правильность которой ранее установлена;

в) рассмотрение результатов изучения линейности валидируемой методики: если свободный член в уравнении, приведенном в разделе 5, статистически достоверно не отличается от нуля, то использование такой методики дает результаты, свободные от систематической ошибки.

Для подходов «а» и «б» возможно представление полученных данных в виде уравнения линейной зависимости (регрессии) между экспериментально найденными и истинными величинами. Для этого уравнения проверяются гипотезы о равенстве единице тангенса угла наклона b и о равенстве нулю свободного члена a . Как правило, если эти гипотезы признаются верными при степени надежности, равной 0,05, то использование валидируемой методики дает правильные, т. е. свободные от систематической ошибки, результаты.

7. ПРЕЦИЗИОННОСТЬ

Прецизионность методики характеризуется рассеянием результатов, получаемых с ее использованием, относительно величины среднего результата. Мерой такого рассеяния является величина стандартного отклонения результата отдельного определения, полученная для выборки достаточно большого объема. Прецизионность оценивается для любой методики количественного определения по результатам не менее трех определений для

каждого из трех уровней определяемых величин (нижнего, среднего и верхнего), лежащих в пределах аналитической области методики.

Повторяемость также может оцениваться для любой методики количественного определения по результатам не менее шести определений для образцов с содержанием определяемого вещества, близким к номинальному.

Во многих случаях оценка прецизионности может быть проведена по результатам обработки экспериментальных данных методом наименьших квадратов, как указано в ОФС «Статистическая обработка результатов химического эксперимента».

Прецизионность должна исследоваться на однородных образцах и может оцениваться в трех вариантах:

- как повторяемость (сходимость);
- как внутрилабораторная (промежуточная) прецизионность;
- как межлабораторная прецизионность (воспроизводимость).

Результаты оценки методики анализа по каждому из вариантов прецизионности обычно характеризуются соответствующим значением величины стандартного отклонения результата отдельного определения. Обычно при разработке оригинальной методики определяется повторяемость (сходимость) результатов, получаемых с ее использованием. При необходимости включения разработанной методики в нормативную документацию дополнительно определяется ее внутрилабораторная (промежуточная) прецизионность. Межлабораторная прецизионность (воспроизводимость) методики оценивается при предполагаемом ее включении в проект общей фармакопейной статьи, фармакопейной статьи или в нормативную документацию на фармакопейные стандартные образцы.

7.1 Повторяемость (сходимость)

Повторяемость аналитической методики оценивают по независимым результатам, полученным в одинаковых регламентированных условиях в одной лаборатории (один и тот же исполнитель, одно и то же оборудование, один и тот же набор реактивов) в пределах короткого промежутка времени.

7.2 Внутрिलाбораторная (промежуточная) прецизионность

Внутрिलाбораторная (промежуточная) прецизионность валидируемой методики оценивается в условиях работы одной лаборатории (разные дни, разные исполнители, разное оборудование и т. д.).

7.3 Межлабораторная прецизионность (воспроизводимость)

Межлабораторная прецизионность (воспроизводимость) валидируемой методики оценивается при проведении испытаний в разных лабораториях.

8. УСТОЙЧИВОСТЬ

Устойчивость валидируемой методики – это способность сохранять найденные для нее в оптимальных (номинальных) условиях характеристики, приведенные в таблице, при вероятных небольших отклонениях от этих условий проведения анализа. Устойчивость методики не следует определять по отношению к легко контролируемым условиям проведения анализа. Это резко сокращает необходимость в специальном изучении устойчивости. Устойчивость должна изучаться только в тех случаях, когда валидируемая методика основана на использовании особо чувствительных к внешним условиям методов анализа, таких как различные виды хроматографии и функционального анализа. При необходимости оценка устойчивости методики проводится на стадии ее разработки. Если вероятна невысокая устойчивость методики, проверка ее пригодности осуществляется в обязательном порядке непосредственно в процессе практического использования.

Проверка пригодности аналитической системы

Проверка пригодности аналитической системы – это проверка выполнения основных требований, предъявляемых к ней. Система, пригодность которой проверяется, представляет собой совокупность конкретных приборов, реактивов, стандартов и анализируемых образцов. Требования к такой системе обычно конкретизированы в общей фармакопейной статье на соответствующий аналитический метод.

Таким образом, проверка пригодности аналитической системы становится процедурой, включаемой в валидируемую методику.

Представление результатов валидации

Протокол валидации аналитической методики должен содержать:

- ее полное описание, достаточное для воспроизведения и отражающее все условия, необходимые для выполнения анализа;
- оцениваемые характеристики;
- все первичные результаты, которые вошли в статистическую обработку данных;
- результаты статистической обработки данных, полученных экспериментально при разработке или проверке валидируемой методики;
- иллюстративные материалы, такие как копии хроматограмм, полученных методами высокоэффективной жидкостной хроматографии или газовой хроматографии; электрофореграмм, электронных и инфракрасных спектров; фотографии или рисунки хроматограмм, полученных методами тонкослойной или бумажной хроматографии; рисунки кривых титрования, калибровочные графики;
- заключение о пригодности валидируемой методики для включения в нормативный документ.

Материалы валидации отдельных аналитических методик целесообразно оформлять в виде объединенного отчета о валидации.

**Статистическая обработка результатов химического эксперимента
(выдержки)**

ОФС.1.1.0013.15

Требования данной общей фармакопейной статьи распространяются на методы, используемые при статистической обработке результатов химического эксперимента.

Обозначения:

A – измеряемая величина;

a – свободный член линейной зависимости;

b – угловой коэффициент линейной зависимости;

F – критерий Фишера;

f – число степеней свободы;

i – порядковый номер варианты;

L – фактор, используемый при оценке сходимости результатов параллельных определений;

m, n – объемы выборки;

P, \bar{P} – доверительная вероятность соответственно при дву- и односторонней постановке задачи;

Q_1, Q_n – контрольные критерии идентификации грубых ошибок;

R – размах варьирования;

r – коэффициент корреляции;

s – стандартное отклонение;

s^2 – дисперсия;

$s_{\bar{o}}$ – стандартное отклонение среднего результата;

$s_{\bar{o}, \%}$ – относительное стандартное отклонение среднего результата (коэффициент вариации);

s_{lg} – логарифмическое стандартное отклонение;

s_{lg}^2 – логарифмическая дисперсия;
 $s_{lg\sigma_g}$ – логарифмическое стандартное отклонение среднего геометрического результата;
 s_0^2, s_b^2, s_a^2 – общая дисперсия и дисперсия коэффициентов линейной зависимости;
 t – критерий Стьюдента;
 U – коэффициент для расчета границ среднего результата гарантии качества анализируемого продукта;
 x, y – текущие координаты в уравнении линейной зависимости;
 X_i, Y_i – вычисленные, исходя из уравнения линейной зависимости, значения переменных x и y ;
 \bar{x}, \bar{y} – средние выборки (координаты центра линейной зависимости);
 x_i, y_i – i -тая варианта (i -тая пара экспериментальных значений x и y);
 $\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$ – граничные значения доверительного интервала среднего результата;
 $x_i \pm \Delta x$ – граничные значения доверительного интервала результата отдельного определения;
 d, Δ – разность некоторых величин;
 α – уровень значимости, степень надежности;
 Δx – полуширина доверительного интервала величины;
 δ – относительная величина систематической ошибки;
 $\varepsilon, \bar{\varepsilon}$ – относительные ошибки соответственно результата отдельного определения и среднего результата;
 μ – истинное значение измеряемой величины;
 Σ – знак суммирования (сумма);
 X^2 – критерий хи-квадрат.

1. Основные статистические характеристики однородной выборки и их вычисление

Проверка однородности выборки. Исключение выпадающих значений вариант. Термином «выборка» обозначают совокупность статистически эквивалентных найденных в эксперименте величин (вариант).

В качестве такой совокупности можно, например, рассматривать ряд результатов, полученных при параллельных определениях содержания какого-либо вещества в однородной по составу пробе.

Допустим, что отдельные значения вариант выборки объема n обозначены через x_i ($1 \leq i \leq n$) и расположены в порядке возрастания:

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

Результаты, полученные при статистической обработке выборки, будут достоверны лишь в том случае, если эта выборка однородна, т. е. если варианты, входящие в нее, не отягощены грубыми ошибками, допущенными при измерении или расчете. Такие варианты должны быть исключены из выборки перед окончательным вычислением ее статистических характеристик. Для выборки небольшого объема ($n < 10$) идентификация вариант, отягощенных грубыми ошибками, может быть выполнена, исходя из величины размаха варьирования R . Для идентификации таких вариант в выборке большого объема ($n \geq 10$) целесообразно проводить предварительную статистическую обработку всей выборки, полагая ее однородной, и уже затем на основании найденных статистических характеристик решать вопрос о справедливости сделанного предположения об однородности.

В большинстве случаев среднее выборки \bar{x} является наилучшей оценкой истинного значения измеряемой величины μ , если его вычисляют как среднее арифметическое всех вариант:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}. \quad (1.2)$$

При этом разброс вариант x_i вокруг среднего \bar{x} характеризуется величиной стандартного отклонения s . В количественном химическом анализе величина s часто рассматривается как оценка случайной ошибки, свойственной данному методу анализа. Квадрат этой величины s^2 называют дисперсией. Величина дисперсии может рассматриваться как мера воспроизводимости результатов, представленных в данной выборке. Вычисление величин (оценок) s и s^2 проводят по уравнениям (1.5) и (1.6). Иногда для этого предварительно определяют значения отклонений d_i и число степеней свободы (число независимых вариант) f :

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

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

$$s^2 = \frac{\sum_1^n d_i^2}{f} = \frac{\sum_1^n x_i^2 - n \cdot \bar{x}^2}{f}, \quad (1.5)$$

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

Стандартное отклонение среднего результата $s_{\bar{x}}$ рассчитывают по уравнению:

$$s_{\bar{x}} = \frac{s}{\sqrt{n}} \quad (1.7)$$

Отношение $s_{\bar{x}}$ к \bar{x} , выраженное в процентах, называют относительным стандартным отклонением среднего результата или коэффициентом вариации $s_{\bar{x}}$, %.

Проверка однородности выборок малого объема ($n < 10$) осуществляется без предварительного вычисления статистических характеристик, с этой целью после представления выборки в виде (1.1) для крайних вариант x_1 и x_n рассчитывают значения контрольного критерия Q , исходя из величины размаха варьирования R :

$$R = |x_1 - x_n|, \quad (1.12)$$

$$Q_1 = \frac{|x_1 - x_2|}{R}, \quad (1.13 \text{ а})$$

$$Q_n = \frac{|x_n - x_{n-1}|}{R}. \quad (1.13 \text{ б})$$

Выборка признается неоднородной, если хотя бы одно из вычисленных значений Q превышает табличное значение $Q(\bar{P}, n)$, найденное для доверительной вероятности \bar{P} . Варианты x_1 или x_n , для которых соответствующее значение $Q > Q(\bar{P}, n)$, отбрасываются и для полученной выборки уменьшенного объема выполняют новый цикл вычислений по уравнениям (1.12) и (1.13) с целью проверки ее однородности. Полученная в конечном счете однородная выборка используется для вычисления \bar{x} , s^2 , s и s_x^- .

Для выборок большого объема ($n \geq 10$) проверку однородности проводят после предварительного вычисления статистических характеристик \bar{x} , s^2 , s и s_x^- . При этом выборка признается однородной, если для всех вариантов выполняется условие:

$$|d_i| \leq 3s. \quad (1.14)$$

Если выборка признана неоднородной, то варианты, для которых $|d_i| > 3s$, отбрасываются как отягощенные грубыми ошибками с доверительной вероятностью $P > 99,0\%$. В этом случае для полученной выборки сокращенного объема повторяют цикл вычислений статистических характеристик по уравнениям (1.2), (1.5), (1.6), (1.9) и снова проводят проверку однородности. Вычисление статистических характеристик считают законченным, когда выборка сокращенного объема оказывается однородной.

2. Доверительные интервалы и оценка их величины

Если случайная однородная выборка конечного объема n получена в результате последовательных измерений некоторой величины A , имеющей

истинное значение μ , то среднее этой выборки \bar{x} следует рассматривать лишь как приближенную оценку величины A . Достоверность этой оценки характеризуется величиной доверительного интервала $\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$, для которой с заданной доверительной вероятностью P выполняется условие:

$$(\bar{x} - \Delta\bar{x}) \leq \mu \leq (\bar{x} + \Delta\bar{x}). \quad (2.1)$$

Расчет граничных значений доверительного интервала проводят по критерию Стьюдента, предполагая, что варианты, входящие в выборку, распределены нормально:

$$(\bar{x} \pm \Delta\bar{x}) = \bar{x} \pm \frac{t(P,f) \cdot s}{\sqrt{n}}. \quad (2.2)$$

Здесь $t(P, f)$ – табличное значение критерия Стьюдента.

Таблица I

Критические значения контрольного критерия $Q(P, n)$

n	Q		
	$P = 90 \%$	$P = 95 \%$	$P = 99 \%$
3	0,89	0,94	0,99
4	0,68	0,77	0,89
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

Критические значения критерия Стьюдента

f	Доверительная вероятность			f	Доверительная вероятность		
	$P = 95 \%$	$P = 99 \%$	$P = 99,9$		$P = 95$	$P = 99 \%$	$P = 99,9$
1	12,71	63,60		21	2,08	2,83	3,82
2	4,30	9,93	31,60	22	2,07	2,82	3,79
3	3,18	5,84	12,94	23	2,07	2,81	3,77
4	2,78	4,60	8,61	24	2,06	2,80	3,75
5	2,57	4,03	6,86	25	2,06	2,79	3,73
6	2,45	3,71	5,96	26	2,06	2,78	3,71
7	2,37	3,50	5,41	27	2,05	2,77	3,69
8	2,31	3,36	5,04	28	2,05	2,76	3,67
9	2,26	3,25	4,78	29	2,04	2,76	3,66
10	2,23	3,17	4,59	30	2,04	2,75	3,65
11	2,20	3,11	4,44	40	2,02	2,70	3,55
12	2,18	3,06	4,32	50	2,01	2,68	3,50
13	2,16	3,01	4,22	60	2,00	2,66	3,46
14	2,15	2,98	4,14	80	1,99	2,64	3,42
15	2,13	2,95	4,07	10	1,98	2,63	3,39
16	2,12	2,92	4,02	12	1,98	2,62	3,37
17	2,11	2,90	3,97	20	1,97	2,60	3,34
18	2,10	2,88	3,92	50	1,96	2,59	3,31
19	2,09	2,86	3,88	∞	1,96	2,58	3,29
20	2,09	2,85	3,85				
f	$p = 0,05$	$p = 0,01$	$p = 0,001$	f	$p = 0,05$	$p = 0,01$	$p = 0,001$
	Уровень значимости				Уровень значимости		

Критические значения критерия Фишера

f_2 – число степене й свобод	f_1 – число степеней свободы для большей дисперсии									
	1	2	3	4	5	6	7	8	20	∞
3	10,13 34,12	9,55 30,81	9,28 29,46	9,12 28,71	9,01 28,24	8,94 27,91	8,88 27,67	8,84 27,49	8,66 26,69	8,53 26,12
6	5,99 13,74	5,14 10,92	4,76 9,78	4,53 9,15	4,39 8,75	4,28 8,47	4,21 8,26	4,15 8,10	3,87 7,39	3,67 6,88
9	5,12 10,56	4,26 8,02	3,86 6,99	3,63 6,42	3,48 6,06	3,87 5,80	3,29 5,62	3,23 5,47	2,93 4,80	2,71 4,31
12	4,75 9,33	3,89 6,93	3,49 5,95	3,26 5,41	3,11 5,06	3,00 4,82	2,91 4,64	2,85 4,50	2,54 3,86	2,30 3,36
15	4,54 8,68	3,68 6,36	3,29 5,42	3,06 4,89	2,90 4,56	2,79 4,32	2,71 4,14	2,64 4,00	2,33 3,37	2,07 2,87
20	4,35 8,10	3,49 5,85	3,10 4,94	2,87 4,43	2,71 4,10	2,60 3,87	2,51 3,70	2,45 3,56	2,12 2,94	1,84 2,42
30	4,17 7,56	3,32 5,39	2,92 4,51	2,69 4,02	2,53 3,70	2,42 3,47	2,33 3,30	2,27 3,17	1,93 2,55	1,62 2,01
60	4,00 7,08	3,15 4,98	2,76 4,13	2,53 3,65	2,37 3,34	2,25 3,12	2,17 2,95	2,10 2,82	1,75 2,20	1,39 1,60
∞	3,84 6,63	3,00 4,61	2,60 3,78	2,37 3,32	2,21 3,02	2,10 2,80	2,01 2,64	1,94 2,51	1,57 1,88	1,00 1,00

F для $P = 95\%$ напечатаны жирным шрифтом, а F для $P = 99\%$ – обычным.

ПРИЛОЖЕНИЕ 5

Ответы на тестовые вопросы:

№	Ответ	№	Ответ
1	1	11	2
2	3	12	3
3	1	13	4
4	4	14	2
5	2	15	1
6	1	16	4
7	3	17	2
8	3	18	2
9	4	19	1
10	1	20	4