

Н. А. Эпштейн

## ОЦЕНКА ПРЕДЕЛА КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ С УЧЕТОМ ТРЕБОВАНИЙ К ВОСПРОИЗВОДИМОСТИ РЕЗУЛЬТАТОВ АНАЛИЗА

ОАО "Химфармкомбинат "Акрихин", Старая Купавна Московской области

**Предел количественного определения (Limit of Quantitation, LOQ)** — наименьшая концентрация аналита, которая может быть определена с приемлемой воспроизводимостью и правильностью при регламентированных условиях метода [1–5]. ICH [4] рекомендует несколько способов оценки LOQ для методик определения содержания примесей, однако ни один из способов не учитывает требования к приемлемой воспроизводимости результатов анализов, и в том числе — способ оценки LOQ с использованием калибровочной прямой:  $LOQ = 10 (SD/b)$ , где  $b$  — наклон калибровочной прямой,  $SD$  — стандартное отклонение сигнала [4].

По нашему мнению, более правильную оценку предела количественного определения, учитывающую требования к воспроизводимости результатов анализа, можно получить по калибровочной прямой следующим способом.

По величине откликов  $Y$  (площадям пика аналита) в пределах калибровочной прямой  $Y = a + bC$  и ниже, вычисляют: 1) теоретические значения результатов анализов  $C = (Y - a)/b$  и 2) стандартные отклонения  $SD_c$  и относительные стандартные отклонения  $RSD$  результатов анализов:  $RSD = (SD_c \cdot 100)/C$ . Затем по зависимости  $RSD - C$  устанавливают концентрацию аналита  $C_p$ , соответствующую допустимой величине относительного стандартного отклонения, указанной в тестируемой методике. Эта концентрация  $C_p$  и есть

предел количественного определения, учитывающий требования к  $RSD$ .

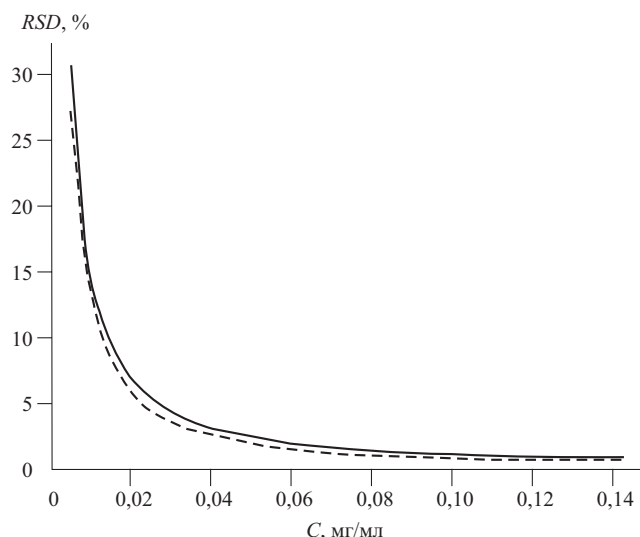
Значения стандартных отклонений результатов анализов  $SD_c$  вычисляют по формуле [6]:

$$SD_c = \frac{SD_o}{b} \sqrt{\frac{1}{N} + \frac{1}{m} + \left(\frac{SD_b}{b}\right)^2 \cdot \left(\frac{Y_s - \bar{Y}}{SD_o}\right)^2}$$

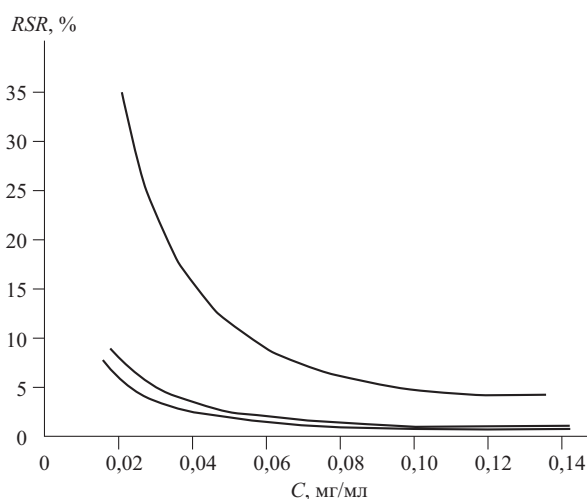
с  $f = N - 2$  степенями свободы,

где  $SD_o$  — стандартное отклонение линейной зависимости (калибровочной прямой),  $N$  — количество экспериментальных точек калибровочной прямой,  $Y_s$  — величина отклика (площадь пика),  $m$  — количество параллельных определений,  $b$  — наклон калибровочной прямой и  $SD_b$  — его стандартное отклонение,  $\bar{Y} = Y_k/N$  — среднее значение отклика всех экспериментальных точек, использованных для вычисления калибровочной прямой.

Этот способ оценки предела количественного определения наиболее эффективен при валидации (проверке пригодности) методик. Дело в том, что при тестировании валидационной характеристики "правильность" анализируют ряд растворов с точно известным содержанием аналита в предполагаемом диапазоне действия методики. Получаемые данные можно рассматривать как точки калибровочной прямой и одновременно с оценкой правильности находить другие валидационные характеристики, в том числе — предел количественного определения.



**Рис. 1.** Зависимость относительного стандартного отклонения  $RSD$  результата анализа от концентрации пропилпарабена, полученная с использованием калибровочной прямой  $S = -0,3717 + 280,7C$ ;  $N = 9$ ,  $r = 0,9995$ ,  $SD_o = 0,3769$ ,  $SD_b = 3,441$ ,  $\bar{Y} = 26,06$ . Сплошная линия для  $m = 2$  параллельных определений, пунктир для  $m = 5$ .



**Рис. 2.** Влияние коэффициента корреляции  $r$  калибровочной прямой на относительное стандартное отклонение  $RSD$  результатов определения пропилпарабена.  $r = 0,980$  — верхняя кривая;  $0,9990$  — средняя кривая;  $0,9995$  — нижняя кривая. Пояснения см. в тексте.

Таблица 1

Исследование влияния коэффициента корреляции калибровочной прямой на *RSD* результатов ВЭЖХ анализов и на величину предела количественного определения

№	Исходные данные для калибровочной прямой		Данные, измененные (курсив) для получения определенного коэффициента корреляции	
	Концентрация пропилпарабена $C_i$ (мг/мл)	Площадь* пика, $S_i \cdot 10^4$	$S_i \cdot 10^4$	$S_i \cdot 10^4$
1	0,1487	41,22	<i>42,00</i>	<i>45,00</i>
2	0,1469	41,11	41,11	<i>40,00</i>
3	0,1190	32,34	32,34	<i>38,00</i>
4	0,1033	29,05	29,05	<i>33,00</i>
5	0,0967	27,20	27,20	<i>26,00</i>
6	0,0735	20,03	20,03	<i>22,00</i>
7	0,0517	14,10	14,10	<i>16,00</i>
8	0,0595	16,28	16,28	<i>20,00</i>
9	0,0483	13,22	<i>12,00</i>	<i>13,00</i>
Параметры калибровочной прямой $S = a + bC$				
Коэффициент корреляции $r$	0,9995	0,9990	0,980	
Стандартное отклонение $SD_o$	0,3769	0,5284	2,393	
“ $a$ ”	-0,3717	-0,3717	-1,192	
$SD_a$	0,3476	0,4873	2,207	
“ $b$ ”	280,7	280,7	288,9	
$SD_b$	3,441	4,824	21,85	
$C$ (среднее)	0,09418	0,09418	0,09418	
$S$ (среднее)	26,06	26,01	28,11	
LOQ для $RSD$ 2,0 % ( $m = 5$ ), мг/мл	0,048	0,060	( $RSD > 4,0$ %)	
LOQ для $RSD$ 5,0 % ( $m = 5$ ), мг/мл	0,023	0,030	0,093	
LOQ по ICH: 10 ( $SDa/b$ ), мг/мл	0,012	0,017	0,077	
$RSD\%$ при LOQ по ICH и $m = 5$	10,5	9,7	-	

\* По пяти ( $m$ ) параллельным определениям

В качестве примера на рис. 1 показаны зависимости относительного стандартного отклонения (*RSD*) результатов ВЭЖХ анализов пропилпарабена от его концентрации ( $C$ ) для  $m = 2$  параллельных определений (сплошная линия) и  $m = 5$  (пунктир)<sup>1</sup>. Они рассчитаны по параметрам калибровочной прямой, приведенным в табл. 1. По этим зависимостям можно легко устанавливать минимальную концентрацию, для которой выполняется заданное требование к воспроизводимости результатов анализов. Так требование “относительное стандартное отклонение результатов анализов не должно превышать 2,0 %” выполняется при  $m = 2$  вплоть до концентрации  $C_p = 0,057$  мг/мл, при  $m = 3$  до 0,052 мг/мл, при  $m = 5$  до 0,048 мг/мл. Если методикой допускается *RSD* до 5,0 %, как при определении содержания примесей, то  $C_p = 0,023$  мг/мл ( $m = 5$ ).

Отметим, что при альтернативном расчете предела количественного определения по формуле рекомендуемой ICH:  $LOQ = 10 (SD/b)$  [5] получается более низ-

<sup>1</sup> Здесь и далее все расчеты выполнены с использованием Microsoft Excel.

Таблица 2

Оценка предела количественного определения примеси III в субстанции SMT по параметрам калибровочной прямой

№	Исходные данные для калибровочной прямой	
	Концентрация примеси III $C_i$ (мг/мл)	Площадь пика $S_i \cdot 10^4$
1	0,000210	11,58
2	0,000420	23,17
3	0,00105	57,090
4	0,00210	108,52
5	0,00315	163,52
6	0,00420	210,75
7	0,00630	316,62
Параметры калибровочной прямой $S = a + bC$		
Коэффициент корреляции $r$		0,9998
Стандартное отклонение $SD_o$		2,127
“ $a$ ”		3,117
$SD_a$		1,263
“ $b$ ”		49880
$SD_b$		391,1
$C$ (среднее)		0,00249
$S$ (среднее)		127,3
LOQ для $RSD$ 2,0 % ( $m = 5$ ), мг/мл		0,0013
LOQ для $RSD$ 5,0 % ( $m = 5$ ), мг/мл		0,00058
LOQ по ICH: 10 ( $SDa/b$ ), мг/мл		(0,00025)
$RSD\%$ при LOQ по ICH и $m = 5$		(12,5)

кое значение — 0,012 мг/мл. Однако при этой концентрации *RSD* результатов анализов составляет 10,5 % (рис. 1, табл. 1), что неприемлемо.

Известно, что на результаты анализов существенное влияние оказывает коэффициент корреляции калибровочной прямой. Поэтому исследовали влияние коэффициента корреляции калибровочной прямой на величины *RSD*. Исходные данные, полученные при определении калибровочной прямой (коэффициент корреляции  $r = 0,9995$ ), изменяли таким образом, чтобы получить модифицированные калибровочные прямые с коэффициентами корреляции 0,9990 и 0,980. Полученные результаты представлены в табл. 1 и на рис. 2. Из табл. 1 и рис. 2 следует:

1) при коэффициенте корреляции 0,980 достижимы только значения  $RSD > 4$  %, причем предел количественного определения в 4 раза превышает аналогичный показатель при  $r = 0,9995$  и в 3 раза — при  $r = 0,9990$ ; значения *RSD* резко возрастают при снижении концентрации аналита

2) только калибровочные прямые с коэффициентом корреляции  $r = 0,9990$  и выше дают возможность получать достаточно низкие значения предела количественного определения, соответствующие приемлемым величинам *RSD*.

Заметим, что высокие значения LOQ в случае пропилпарабена вызваны тем, что молекула пропилпарабена содержит сравнительно слабый хромофор — бензольное ядро. В табл. 2 представлены данные, полученные при ВЭЖХ анализе растворов стандартного образца примеси III в одной из лекарственных субстанций, причем примесь содержит сильные хромо-

формные группы. Эти данные использованы для расчета параметров калибровочной прямой и их статистических характеристик. Установлено (табл. 2), что предел количественного определения примеси III, вычисленный с учетом требований к воспроизводимости результатов анализов составляет при  $RSD \leq 5,0\%$  — 0,00058 мг/мл. А предел количественного определения, найденный по формуле  $LOQ = 10 SDa/b$ , не учитывающей требования к воспроизводимости результатов анализов — 0,00025 мг/мл. При этой концентрации  $RSD = 12,5\%$  при 5 параллельных определениях, что неприемлемо.

Таким образом, предложен метод оценки предела количественного определения по статистическим характеристикам калибровочной прямой, который дает возможность учитывать требования к воспроизводимости результатов анализов, как и должно быть в соот-

ветствии со строгим определением этой метрологической характеристики.

## ЛИТЕРАТУРА

1. International Conference on Harmonization (ICH), Text on Validation of Analytical Procedures (1994).
2. International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use, *Validation of analytical procedures*, ICH-Q2A, Geneva (1995).
3. International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use, *Validation of analytical procedures: Methodology*, ICH-Q2B, Geneva (1996).
4. Reviewer Guidance: Validation of Chromatographic Methods. Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Washington (1994).
5. United States Pharmacopoeia. Validation of compendial methods, V. 24 (2000), pp. 2149 – 2152.
6. К. Дёрффель, *Статистика в аналитической химии*, Мир, Москва (1994).

Поступила 21.05.02