

MINISTERUL SĂNĂTĂȚII AL REPUBLICII MOLDOVA
UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
„NICOLAE TESTEMIȚANU”

Facultatea de Farmacie
Catedra de chimie farmaceutică și toxicologică

Livia UNCU, Elena DONICI

VALIDAREA METODELOR
DE ANALIZĂ
Recomandare metodică

SRL "Foxtrot"
Chisinau, 2023

Aprobat la ședința Consiliului de Management al Calității al USMF
”Nicolae Testemițanu” (proces verbal nr. 7 din 30.06.2023)

Autori:

Livia Uncu, dr. șt. farm., conf. univ.

Elena Donici, dr. șt. farm., asist. univ.

Recenzenți:

Valica Vladimir, dr. hab. șt. farm., prof. univ., șef Catedră de chimie farmaceutică și toxicologică, USMF „Nicolae Testemițanu”;

Treapițina Tatiana, dr. șt. farm., conf. univ., Catedra de chimie farmaceutică și toxicologică, USMF „Nicolae Testemițanu”.

Sub redacția autorului: Uncu Livia

Tipărit la: SRL "Foxtrot"

DESCRIEREA CIP A CAMEREI NAȚIONALE A CĂRȚII DIN REPUBLICA MOLDOVA

Uncu, Livia.

Validarea metodelor de analiză: Recomandare metodică / Livia Uncu, Elena Donici; sub redacția: Uncu Livia; Ministerul Sănătății al Republicii Moldova, Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie "Nicolae Testemițanu", Facultatea de Farmacie, Catedra de chimie farmaceutică și toxicologică. – Chișinău: [S. n.], 2023 (Foxtrot). – 48 p.: tab. Bibliogr.: p. 40-44 (30 tit.). – [100] ex.

ISBN 978-9975-89-282-7.

615.3:543(076)

U 46

CUPRINS

PREFAȚĂ	4
ABREVIERI	5
INTRODUCERE	6
SUBIECTE PENTRU PREGĂTIREA INDIVIDUALĂ A STUDENTULUI ÎN BAZA MATERIALULUI TEORETIC	8
MATERIAL INFORMATIV	9
Procesul de validare a unei metode analitice. Aspecte generale	9
Parametrii de validare a unei metode de analiză	10
Particularități metodologice ale parametrilor de validare	17
Interpretarea rezultatelor statistice ale validării. Metode de calcul în procesul de validare	22
Particularități de validare a unor metode uzuale aplicate în analiza medicamentelor	25
Abordarea practică a unui protocol general de validare a unei metode analitice	30
SARCINI PENTRU LUCRUL INDIVIDUAL	37
BIBLIOGRAFIE	40
<i>Anexa 1. Fișa de lucru. Validarea unei metode de dozare. Rezultatele studiului parametrului „Liniaritate”</i>	45
<i>Anexa 2. Fișa de lucru. Validarea unei metode de dozare. Rezultatele studiului parametrului „Exactitate”</i>	47
<i>Anexa 3. Fișa de lucru. Validarea unei metode de dozare. Rezultatele studiului parametrului „Precizie”</i>	48
<i>Anexa 4. Fișa de lucru. Validarea unei metode de dozare. Rezultatele studiului parametrului „Robustețe”</i>	48

PREFAȚĂ

Dezvoltarea metodelor analitice cu aplicabilitate asupra medicamentelor presupune instantaneu verificarea și confirmarea faptului, că metoda (sau procedeul analitic) corespunde întocmai scopului pentru care a fost concepută/dezvoltată. Cu alte cuvinte, o metodă analitică trebuie validată. Conceptul de validare poate fi interpretat și ca o metodologie de acreditare științifică a unei metode de analiză. Principalul scop al validării constă în selectarea celor mai bune și mai accesibile metode de detecție și de dozare a unei substanțe medicamentoase/impurități farmaceutice/produse de degradare. Procesul de validare se bazează pe date și performanțe obiective, toate determinările fiind realizate în strictă concordanță cu reglementările în domeniul analizei și controlului de medicamente.

Recomandarea metodică *Validarea metodelor de analiză* este concepută ca material didactic pentru studenții programului de studii 0916. Farmacie, rezidenților de la specializările farmaceutice, masteranzilor, doctoranzilor, farmaciștilor, dar poate fi drept suport și pentru specialiști din domenii conexe sau oricine este interesat în domeniul validării metodelor de analiză.

Autorii.

ABREVIERI

a.	– anul
ed.	– ediția
etc.	– etcetera
exp.	– experimental
FDA	– Food and Drug Administration
GLP	– Good Laboratory Practice
HPLC	– Cromatografia Lichidă de Înaltă Performanță
ICH	– Conferința Internațională de Armonizare
ISO	– Organizația Internațională de Standardizare
min.	– minut(e)
UV-Vis	– ultraviolet-vizibil

INTRODUCERE

Importanța validării unei proceduri analitice se conturează prin siguranța obținerii unor rezultate fiabile și repetabile pentru analiza de rutină și a stabilității.

Din punct de vedere etic, validarea unei metode este importantă deoarece pacienții au încredere în rezultatele obținute în laborator prin analiza unui medicament pe care ei nu sunt în putere să o facă singuri. Pe de altă parte, farmaciștii-analiști, în procesul de validare a unei metode, vor aplica toate aspectele științei pentru a obține rezultate de încredere.

La fel și din punct de vedere comercial, este foarte important să existe o siguranță că o metodă va da rezultate exacte și precise înainte de a fi efectuate. Însă, există și un neajuns al validării unei metode de analiză în această privință: în urma efectuării măsurătorilor, pot fi detectate erori și se va necesita repetare experimentelor. În mediul comercial, în care producătorul are datoria de a asigura calitatea medicamentului înainte de a fi eliberat consumatorului, validarea preia o parte din această răspundere.

În unele domenii, validarea metodelor potrivit GLP, este o cerință de reglementare și este obligatorie pentru anumite tipuri de cercetări. Astfel, este indispensabilă validarea metodelor acreditate conform standardului ISO. Evaluarea parametrilor de performanță a unei metode în timpul procesului de validare se furnizează date care arată care părți ale metodei sunt stabile precum și unde sunt punctele slabe. Validarea ajută la proiectare și implementarea unor proceduri

adecvate de control al calității. Datele obținute în urma validării unei metode furnizează informații care să permită comparabilitatea rezultatelor din probele analizate în diferite laboratoare.

Scopul: de a putea defini principiile validării unei metode analiză și a cunoaște metodologiile generale de lucru.

Durata minimă recomandată

Pentru studierea temei se acordă 2 lucrări de laborator (6 ore).

Etapale studierii temei:

1. Pregătirea teoretică pentru îndeplinirea scopurilor determinate.
2. Realizarea însărcinărilor practice.
3. Evaluarea curentă a cunoștințelor.

Obiectivele temei:

1. Pe baza consultării suportului de curs și a literaturii de specialitate de a însuși noțiunile generale privind validarea unei metode de analiză;
2. Cunoașterea aspectelor generale ale procesului de validare a unei metode analitice;
3. Cunoașterea și aprecierea parametrilor de validare a unei metode de analiză;
4. Întocmirea unui raport de validare.

**SUBIECTE PENTRU PREGĂTIREA INDIVIDUALĂ A
STUDENTULUI ÎN BAZA MATERIALULUI TEORETIC**

1. Noțiune de validare a unei metode analitice. Indicați parametrii de validare.
2. Rolul validării în analiza farmaceutică.
3. Specificitatea – parametrul validării. Definiția, caracterizare și aplicare.
4. Liniaritatea – parametrul validării. Definiția, caracterizare și aplicare.
5. Precizia – parametrul validării. Definiția, caracterizare și aplicare.
6. Exactitatea – parametrul validării. Definiția, caracterizare și aplicare.
7. Limita de detecție – parametrul validării. Definiția, caracterizare și aplicare.
8. Limita inferioară de cuantificare – parametrul validării. Definiția, caracterizare și aplicare.
9. Robustețea – parametru al validării. Definiția, caracterizare și aplicare.
10. Întocmirea unui raport de validare.

MATERIAL INFORMATIV

Procesul de validare a unei metode analitice. Aspecte generale

Validarea unei metode analitice, conform Farmacopeei Statelor Unite ale Americii 31, este „procesul prin care se stabilește prin studii de laborator, dacă acea metodă îndeplinește condițiile pentru aplicațiile analitice pentru care a fost pusă la punct”.

Astfel, procesul de validare are rolul de a verifica și a stabili care sunt limitele de variabilitate între care metoda va prezenta rezultate specifice, exacte și precise.

În domeniul analizei farmaceutice, procesul de validare a unei metode este reglementat în ghiduri de validare. Pentru prima dată, în a. 1987 FDA a emis ghiduri practice privind principalele principii ale validării și despre prezentarea probelor și a analizelor date referitoare la validarea metodelor. În a. 1993, în cadrul ghidului ICH, apar primele recomandări generalizate privind validarea metodelor de analiză, aceste documente fiind publicate în a. 1994 și tratată mai detaliat în 1995.

În prezent, procesul de validare a unei metode de analiză este reglementat în următoarele acte normative:

- ghidul ICH Q2R1: pentru proceduri analitice și validare; Ghidul ICH Q2R2 este în proces de aprobare, disponibil pentru discuții;
- Farmacopeea Europeană, ed. a XI-a;
- Farmacopeea Statelor Unite ale Americii: 1225 Validation of compendial methods;

- Agenția Alimentelor și Medicamentului a Statelor Unite ale Americii: Ghidul „Validarea metodelor de analiza pentru medicamente și substanțe biologice”;
- Centrul pentru Evaluarea și Cercetarea Medicamentelor: Ghidul „Validarea unei metode bioanalitice”.

Ghidurile ICH în domeniul calității (*The International Conference of Harmonisation of Technical Requirements*) reflectă o abordare armonizată privind asigurarea controlului calității medicamentelor. Acestea completează și oferă explicații privind cerințele monografiilor Farmacopeice. Ghidurile Q2(R1) și Q2(R2) *Validarea procedurilor analitice/Validation of Analytical Procedures* identifică parametrii de validare necesari pentru o varietate de metode analitice. De asemenea, se descriu caracteristicile care trebuie luate în considerare la validarea procedurilor analitice.

Parametrii de validare a unei metode de analiză

Oricare metodă de analiză nou elaborată trebuie validată, dar și cele care deja au fost dezvoltate și incluse în farmacopee sau în alte documente analitice recunoscute, dar au suferit mici schimbări în tehnica de lucru, de asemenea necesită a fi revalidate. Astfel, trebuie verificat în condițiile reale dacă o metodă de analiză va da rezultate precise și exacte utilizându-se acte normative bine documentate. La realizarea procesului de validare sau revalidare a unei metode se va lua în considerare în primul rând de parametrii incluși în ghidurile ICH, care abordează validarea metodelor de analiză (figura 1).

Alegerea parametrilor de validare care trebuie testați este influențată de:

- scopul măsurătorilor analitice (dozarea unei substanțe medicamentoase, determinări de impurități, studii de stabilitate, determinări de medii biologice etc.);
- procedura analitică;
- natura și concentrația analitului;
- natura matricei;
- reglementările în domeniu.

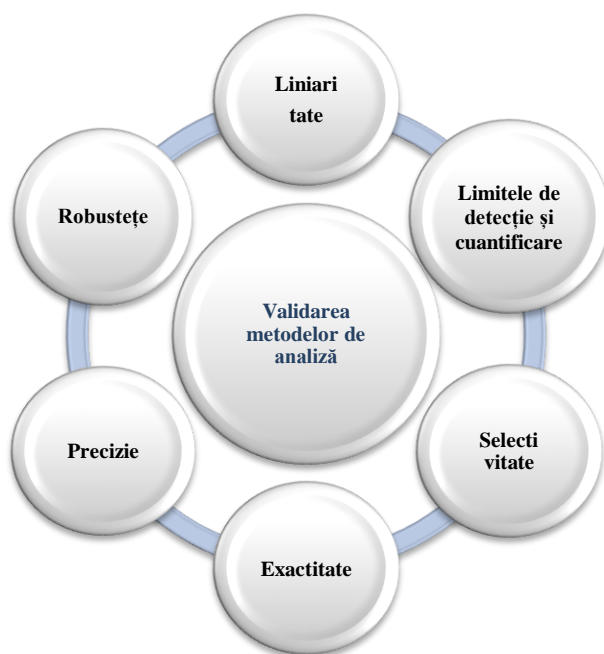


Figura 1. Parametrii de validare a unei metode analitice

În Tabelul 1 sunt enumerați cei mai importanți parametri pentru validarea diferitelor tipuri de proceduri analitice, conform Ghidului ICH Q2(R1). Aceiași parametri se vor utiliza și în cazul revalidării, care poate fi necesară în următoarele circumstanțe:

- modificări ale sintezei substanței medicamentoase;
- modificări în compoziția medicamentului;
- modificări în metoda analitică.

Tabelul 1. Parametrii de validare pentru diferite tipuri de metode de analiză

Metodele de analiză/ Parametrii de validare	Metodă de identificare	Metodă de determinare a impurităților		Metodă de dozare
		Identificarea impurităților	Determinarea cantitativă a impurităților	
Specificitatea	+	+	+	+
Exactitatea			+	+
Precizia: Repetabilitatea Precizia intermediară			+ + (1)	+ + (1)
Limita de detecție	+	+	(2)	+ (3)
Limita inferioară de cuantificare			+	+(3)
Liniaritatea			+	
Robustețea	+	+	+	+

„+” *Obligatoriu*

(1) *În cazurile în care se va realiza parametrul de reproductibilitatea, precizia intermediară*

nu este necesară;

(2) *Limita de detecție în unele situații poate fi necesară;*

(3) *Dacă metoda este dezvoltată la concentrații mici, către limita de detecție a metodei, este obligatoriu să se determine limita de detecție și limita inferioară de cuantificare. Dacă metode se aplică la concentrații mari, atunci acești doi parametri nu este obligatoriu a fi determinați.*

Specificitatea. În Ghidul ICH Q2(R1) specificitatea este definită astfel: „capacitatea metodei de a evalua substanța de analizat în prezența altor compuși care pot fi prezenți, precum: impurități, excipienți etc.”. Acest parametru este folosit atât în metodele destinate pentru identificarea, cât și pentru determinarea purității și conținutului cantitativ al unei substanței medicamentoase:

- în cazul unei metode de identificare, specificitatea are drept scop de a demonstra că metoda este capabilă de a detecta substanța medicamentoasă cu certitudine, chiar și în prezența unor impurități specifice și foarte asemănătoare după structura chimică;
- în cazul unei metode utilizate cu scopul determinării purității, specificitatea vine să asigure puritatea unei substanțe active, prin detectarea și măsurarea exactă a cantității unor impurități înrudite chimic, solvenți, impurități neorganice etc., dacă acestea sunt prezente în substanța medicamentoasă;
- pentru determinarea cantitativă a unei substanțe medicamentoase, specificitatea este un parametru care contribuie la demonstrarea că metoda va putea detecta cu certitudine și cuantifica exact și precis substanța medicamentoasă în prezența altor substanțe precum: excipienți, solvenți, posibilele impurități, aflate în limitele accesibile etc.

Linearitatea unei metode de analiză este un parametru care indică posibilitatea metodei de a obține rezultate direct proporționale cu concentrația substanței medicamentoase. Linearitatea este importantă pentru determinarea cantitativă a unei substanțe active sau

a unei impurități, precum și în cazul testului de dizolvare într-un anumit interval bine definit, întru-cât pentru fiecare lot de medicament conținutul de substanță activă și de impurități potențiale poate varia ușor, motiv pentru care concentrațiile peste și sub valoarea respectivă așteptată trebuie să fie determinate corect.

Linearitatea trebuie evaluată astfel:

- se folosesc cel puțin 5 concentrații de analit, fiecare concentrație fiind realizată și analizată de cel puțin 3 ori, iar rezultatele obținute trebuie analizate statistic, cel mai des prin efectuarea analizei de regresie folosind metoda celor mai mici pătrate;
- r (coeficientul de corelare) să fie între 0,99 și 1,00 (preferabil mai mare de 0,999, dar acest criteriu nu este suficient);
- graficul de regresie liniară (dreapta de calibrare sau etalonare) fiind o medie, atunci coeficientul de variație % al punctelor față de linia de regresie trebuie să fie mai mic decât o valoare limită impusă de reglementările din domeniu; de exemplu în analiza farmaceutică este 2,0% la limita inferioară de cuantificare;
- rezidualii (diferența dintre concentrația calculată din dreapta de regresie și concentrația teoretică, %) nu trebuie să aibă o tendință de creștere sau scădere cu creșterea concentrației și să fie aleatoriu distribuiți într-un anumit interval față de 0; de asemenea, valorile lor trebuie să se încadreze între limitele impuse de reglementările în domeniu.

Într-o dreaptă de regresie liniară $y = mx + c$, coeficientul de regresie este constanta „m” care reprezintă rata de schimbare a unei variabile „y” în funcție de modificarea celeilalte „x” (deci panta), în timp ce „c” este interceptarea Y. Astfel, m este panta și c este intersecția ordonatelor.

Precizia (fidelitatea) este un parametru de validare care reprezintă gradul de concordanță între rezultatele probelor atunci când metoda este repetată de mai multe ori. De regulă precizia se exprimă ca abatere standard sau abatere standard relativă (coeficient de variație) a unei serii de măsurători și trebuie să fie cel mult 2,0%.

Precizia unei metode este de trei tipuri, iar pentru fiecare tip, se determină abaterea standard, abaterea standard relativă și intervalul de încredere:

- *repetabilitatea*, care se efectuează prin repetarea metodei într-un laborator pe o perioadă scurtă de timp, folosind același analist cu același echipament. Repetabilitate ar trebui să fie evaluată utilizând cel puțin nouă determinări care acoperă intervalul metodei. Astfel, de regulă, se face pe trei concentrații și trei replici ale fiecărei concentrații sau utilizând cel puțin șase determinări la 100% din concentrația probei;
- *precizia intermediară*, care este rezultatul variațiilor din cadrul laboratorului datorate evenimentelor aleatoare, cum ar fi zile diferite, analiști diferiți, echipamente diferite etc.
- *reproductibilitatea*, care exprimă precizia dintre laboratoare, fiind demonstrată prin intermediul unui studiu inter-laborator.

Exactitatea unei metode analitice este apropierea rezultatelor obținute prin metoda respectivă de valoarea reală sau adevărată. Se recomandă ca exactitatea să fie determinată utilizând un minim de 9 determinări la cel puțin 3 nivele de concentrație, acoperind intervalul specificat: 3 concentrații a câte 3 replici fiecare.

Limita de detecție este un parametru de validare care se determină prin analiza probelor cu concentrație cunoscută de analit și prin stabilirea aceluși nivel minim la care analitul poate fi detectat, dar nu neapărat cuantificat ca valoare precisă, în condițiile experimentale anterioare. De obicei, limita de detecție se exprimă în unitatea de măsură a concentrației substanței medicamentoase în probă.

În dependență de aparatul utilizat pentru analiză, natura substanței medicamentoase și caracterul metodei există o serie de posibilități pentru determinarea limitei de detecție:

- observarea vizuală;
- raportul semnal-zgomot;
- abaterea standard a răspunsului;
- abaterea standard a pantei graficului de liniaritate.

Pentru determinarea limitei de detecție prin folosirea valorii abaterii standard a pantei drepte de etalonare, care a fost construită la parametrul de liniaritate, se aplică formula de calcul a raportului abaterii standard a interceptelor curbilor de calibrare către panta drepte de etalonare.

Limita inferioară de cuantificare este o caracteristică a procesului de validare a unei metode de analiză, care semnifică cea mai mică concentrație de medicament dintr-o probă cu care se

estimează precizia și acuratețea corespunzătoare în condițiile experimentale afirmate.

Similar precum în cazul limitei de detecție, se recomandă următoarele metode pentru estimarea limitei de cuantificare:

- evaluarea vizuală;
- raportul semnal-zgomot;
- abaterea standard a răspunsului;
- abaterea standard a pantei graficului de liniaritate.

Pentru determinarea limitei de cuantificare prin folosirea valorii abaterii standard a pantei drepte de etalonare, care a fost construită la parametrul de liniaritate, se aplică formula de calcul a raportului abaterii standard a răspunsului către media pantelor curbilor de calibrare.

Robustețea este un parametru prin care se măsoară capacitatea unei metode de analiză de a rămâne neschimbată la modificări mici ale parametrilor metodei. Parametrii variabili ai metodei sunt diferiți, în dependență de tipul metodei ce necesită a fi validată, iar pentru selectarea acestora se va lua în considerare tehnica de lucru.

Particularități metodologice ale parametrilor de validare

Specificitatea. Deși acest parametru inițial era destinat pentru studiile de evaluare a purității și determinării calității medicamentelor sau substanțelor active, în prezent este obligatoriu și pentru cercetarea cantitativă. Pentru a verifica specificitatea se măsoară soluția placebo în același mod ca soluțiile standard în solvent. Soluția placebo conține substanțele auxiliare din forma farmaceutică, dar fără substanța/substanțele activă/active. Soluțiile standard în solvent sunt

soluțiile standard obținute cu substanța de referință în solventul potrivit.

Linearitatea reprezintă cea mai importantă etapă a validării unei metode de dozare și exprimă proporționalitatea semnalului instrumental cu cantitatea existentă în probă, pe un domeniu de concentrații în care exactitatea, precizia și linearitatea sunt acceptabile. Domeniul de concentrații în care se verifică liniaritatea este de obicei domeniul de concentrații în care se așteaptă să se încadreze probele de analizat. Se lucrează în paralel cu soluții standard în solvent (soluțiile standard obținute cu substanța de referință în solventul potrivit) și soluții placebo marcate (soluții standard obținute din probe placebo marcate cu substanță de referință) obținute în zile diferite sau de analiști diferiți. Se lucrează la minim 5 niveluri de concentrație ($k=5$ grupe), fiecare concentrație fiind realizată și analizată de 3 ori ($n=3$) de către analiști diferiți sau în 3 zile diferite pentru aceeași concentrație. Astfel, numărul total de realizări pentru $k=5$ și $n=3$ este egal cu 15 pentru soluțiile standard în solvent, precum și pentru soluțiile placebo marcate, în total fiind 30 de rezultate.

Exactitatea exprimă apropierea rezultatului obținut cu acea metodă de valoare adevărată (teoretică). Se poate determina prin marcarea pe rând a probelor standard de concentrații în intervalul considerat pentru testarea liniarității cu cantități cunoscute de analit a unui placebo (o matrice creată artificial și care reproduce matricea analitului în probele de analizat). Se lucrează la 5 niveluri de concentrație în jurul valorii de interes, fiecare nivel de concentrație fiind realizat de cel puțin 3 ori. Se exprimă ca regăsire a analitului din

forma farmaceutică reconstituită, folosind ca sistem de referință dreapta de calibrare obținută cu soluții etalon.

Precizia se verifică pornind de la determinări efectuate atât pe soluțiile placebo marcat (soluții standard obținute din probe placebo marcate cu substanță de referință), cât și pe soluții standard în solvent (soluțiile standard obținute cu substanța de referință în solventul potrivit). Se lucrează la un nivel de concentrație care ar rezulta pentru soluția obținută prin prelucrarea probei de medicament (*nivel de concentrație 100%* – corespunzător 100% cu nivelul de concentrație al probei, fiind cunoscut și ca nivelul de concentrație așteptat în proba de analizat).

Pentru verificarea repetabilității se prepară și se analizează $n=6$ soluții de către $k=3$ analiști diferiți sau în $k=3$ zile diferite, atât ca soluții standard în solvent, cât și ca soluții placebo marcat.

Limita de detecție. Determinarea limitei de detecție este posibilă prin mai multe metode, în dependență de tipul metodei:

- a. *Evaluarea vizuală*, poate fi utilizată atât pentru metode non-instrumentale, dar și pentru cele instrumentale prin analiza probelor cu concentrații cunoscute de analit pentru a stabil nivelului minim la care analitul poate fi detectat în mod fiabil.
- b. *Raportul semnal-zgomot.* Această metodă poate fi aplicată doar procedurilor analitice care prezintă zgomot de bază. Determinarea raportului semnal-zgomot se realizează prin compararea semnalelor măsurate de la probele cu concentrații mici cunoscute de analit cu cele ale probelor martor și stabilirea concentrației minime la care analitul poate fi

detectat în mod fiabil. Un raport semnal-zgomot între 3 sau 2:1 este în general considerat acceptabil pentru estimarea limitei de detecție.

- c. *Abaterea standard a răspunsului și abaterea standard a pantei graficului de liniaritate.* Limita de detecție poate fi calculată prin formula de calcul (1):

$$LOD = \frac{3,3 \cdot SD}{a}, \quad \text{în care:} \quad (1)$$

LOD – limita de detecție;

SD – deviația standard a intercepției;

a – panta dreptei de etalonare.

Limita inferioară de cuantificare poate fi determinată prin aceleași metode precum și Limita de detecție:

- a. *Evaluarea vizuală* poate fi utilizată pentru metode non-instrumentale, dar și pentru cele instrumentale. Limita inferioară de cuantificare este determinată în general prin analiza probelor cu concentrații cunoscute de analit și prin stabilirea nivelului minim la care analitul poate fi cuantificat cu o acuratețe și precizie acceptabilă.
- b. *Raportul semnal-zgomot.* Precum și în cazul determinării Limitei de detecție, această metodă poate fi aplicată doar procedurilor analitice care prezintă zgomot de bază. Determinarea raportului semnal-zgomot se realizează prin compararea semnalelor măsurate de la probele cu concentrații

mici cunoscute de analit cu cele ale probelor martor și prin stabilirea concentrației minime la care analitul poate fi cuantificat în mod fiabil. Un raport semnal-zgomot tipic este de 10:1.

c. *Abaterea standard a răspunsului și abaterea standard a pantei graficului de liniaritate*

Limita inferioară de cuantificare poate fi determinată cu ajutorul formulei de calcul (2):

$$QL = \frac{10 \cdot SD}{a}, \text{ în care:} \quad (2)$$

QL – limita de cuantificare;

SD – deviația standard a intercepției;

a – panta dreptei de etalonare.

Robustețea. O consecință a evaluării robusteței ar trebui să fie stabilirea unei serii de parametri de adecvare a sistemului (de exemplu, testul de rezoluție) pentru a se asigura că valabilitatea metodei analitice este menținută ori de câte ori va fi utilizată.

Exemple de variații tipice sunt:

- stabilitatea soluțiilor analitice;
- timpul de extracție.

În cazul cromatografiei lichide, exemple de variații tipice sunt:

- influența variațiilor pH-ului într-o fază mobilă;
- influența variațiilor în compoziția fazei mobile;
- coloane diferite (loturi și/sau furnizori diferiți);

- temperatura;
- debitul.

În cazul cromatografiei de gaze, exemple de variații tipice sunt:

- coloane diferite (loturi și/sau furnizori diferiți);
- temperatura;
- debitul.

Interpretarea rezultatelor statistice ale validării.

Metode de calcul în procesul de validare

Specificitatea. Metoda se consideră specifică dacă soluția placebo nu prezintă un semnal măsurabil, de exemplu, în metoda spectrofotometrică UV-Vis, nu există absorbție la lungimea de undă maximă a substanței de analizat, iar în metodele cromatografice, nu există interferență la timpul de retenție al substanței de analizat.

Liniaritatea. Se determină caracteristicile dreptelor de calibrare pentru:

- dreapta obținută cu soluții placebo marcate (soluții standard obținute din probe placebo marcate cu substanță de referință);
- dreapta obținută cu soluții standard.

În continuare se determină:

1. Coeficientul de corelație Pearson, care trebuie să fie mai mare decât 0,99, demonstrând că dreapta aproximează o variație lineară a semnalului analitic cu concentrația.
2. Aplicarea testului **C** de verificare a omogenității dispersiilor între cele 5 nivele de concentrație pentru fiecare dreaptă de calibrare.

Dacă $C_{\text{calculat}} < C_{\text{teoretic}}$, atunci varianțele grupelor de determinări sunt omogene, cu riscul de 5%.

3. Aplicarea testului **F** pentru:

- a) verificarea validității dreptei de regresie (compară erorile de ajustare cu cele experimentale). Dacă $F_{\text{calculat}} < F_{\text{teoretic}}$, atunci F calculat nu este semnificativ și ajustările sunt valide la nivelul de risc de 5%, dreapta fiind validă;
- b) testarea existenței unei pante semnificative (compară variațiile datorate regresiei cu erorile de ajustare și cele experimentale). Pantele celor 2 drepte trebuie să fie semnificative (Y să crească semnificativ cu creșterea lui X , panta să nu tindă către 0). Dacă $F_{\text{calculat}} > F_{\text{teoretic}}$, atunci F_{calculat} este semnificativ. Panta va caracteriza o dependență lineară cu riscul de 5%.

4. Aplicarea testului **t** pentru:

- a) compararea pantelor celor 2 drepte. Dacă $t_{\text{calculat}} < t_{\text{teoretic}}$, atunci cele 2 pante nu diferă semnificativ, la un nivel de risc de 5%;
- b) compararea ordonatelor la origine ale celor 2 drepte. Dacă $t_{\text{calculat}} < t_{\text{teoretic}}$, atunci cele 2 ordonate la origine nu diferă semnificativ, la un nivel de risc de 5%.

Exactitatea se verifică prin:

1. testul **C**, cu ajutorul căruia se testează omogenitatea regăsirii în cele 3 grupe de determinări obținute pe probele cu placebo marcat (soluții standard obținute din probe placebo marcate cu substanță de

- referință). Varianțele deferitelor grupe sunt omogene la un prag de semnificație de 5%, dacă $C_{\text{exp}} < C_{\text{critic}}$;
2. testul **F**, cu ajutorul căruia se validează media regăsirii. Dacă $F_{\text{exp}} < F_{\text{critic}}$, atunci exactitatea (regăsirea) medie a metodei este validă la un prag de semnificație de 5%;
 3. calculării regăsirii relative medii prin care se exprimă exactitatea procentuală, care trebuie să fie între limitele 98% și 102%.

Precizia se verifică prin:

- a) testul **C**, cu ajutorul căruia se testează omogenitatea regăsirii în cele 3 grupe de determinări obținute pe probele cu placebo marcat (soluții standard obținute din probe placebo marcate cu substanță de referință) și soluții standard în solvent. Varianțele deferitelor grupe sunt omogene la un prag de semnificație de 5%, dacă $C_{\text{exp}} < C_{\text{critic}}$;
- b) calcularea coeficientului de variație a repetabilității și al preciziei intermediare după formulele de calcul (3, 4):

$$CVr\% = \frac{S_r}{X_{\text{mediu}}} \cdot 100\% , \quad \text{în care:}$$

(3)

CVr – coeficientul de variație a repetabilității, %;

S_r^2 – varianța de repetabilitate (într-o grupă de determinări);

X_{mediu} – media tuturor determinărilor.

$$CVR\% = \sqrt{\frac{S_r^2 + S_g^2}{X_{\text{mediu}}}} \cdot 100\% , \quad \text{în care:}$$

(4)

CVR – coeficientul de variație a preciziei intermediare, %;

S_r^2 – varianța de repetabilitate (într-o grupă de determinări);

S_g^2 – varianța între grupe de determinări;

X_{mediu} – media tuturor determinărilor.

Coeficientul de variație a repetabilității și al preciziei intermediare nu trebuie să depășească valoarea limită de 2%.

Robustețea este un parametru prin care se măsoară capacitatea unei metode de analiză de a rămâne neschimbată la modificări mici ale parametrilor metodei. Parametrii variabili ai metodei sunt diferiți, în dependență de tipul metodei ce necesită a fi validată, iar pentru selectarea acestora se va lua în considerare tehnica de lucru.

Particularități de validare a unor metode uzuale aplicate în analiza medicamentelor

Spectrofotometria UV-Vis

Validarea metodei spectrofotometrice UV-Vis este esențială pentru a asigura precizia și fiabilitatea rezultatelor obținute cu această tehnică analitică. Iată câteva dintre particularitățile de validare a metodei spectrofotometrice UV-Vis:

- *Linearitate*. Se verifică dacă metoda are o relație liniară între concentrația substanței de interes și absorbția sau transmitanța măsurată. Aceasta se face prin construirea unei curbe de calibrare folosind soluții de referință cu concentrații cunoscute ale analitului.
- *Reproductibilitate și precizie*. Evaluarea capacității metodei de a furniza rezultate consistente și precise în condiții repetitive. Acest

lucru implică măsurarea repetată a acelorași probe și calcularea erorilor de precizie.

- *Limita de detecție și limita de cuantificare.* Se determină pentru a stabili cele mai mici concentrații ale analitului care pot fi detectate și cuantificate cu precizie folosind metoda UV-Vis.
- *Specificitate.* Se stabilește dacă metoda poate distinge analitul de alte substanțe care pot fi prezente în probă. Aceasta poate necesita testarea interferențelor potențiale.
- *Acuratețe.* Se determină cât de aproape sunt valorile măsurate de valorile reale ale concentrației. Acest lucru se face, de obicei, prin analiza de referință a probelor sau prin folosirea probelor certificate.
- *Stabilitatea soluției.* Se verifică stabilitatea probei de-a lungul timpului, în special dacă măsurările sunt realizate pe parcursul mai multor ore.
- *Robustețe.* Se testează capacitatea metodei de a furniza rezultate valabile în fața variațiilor minore ale condițiilor experimentale, cum ar fi schimbările de temperatură sau de pH.
- *Răspunsul la liniile spectrale.* Se determină dacă detectorul și sursa de lumină folosite în instrumentul UV-Vis sunt calibrate corespunzător și că acoperă gama de lungimi de undă relevante pentru analiză.
- *Documentarea adecvată.* Înregistrarea și documentarea detaliată a tuturor etapelor de validare, precum și a procedurilor standard de

lucru, este esențială pentru a asigura reproductibilitatea și verificabilitatea rezultatelor.

- *Evaluarea incertitudinii.* Determinați incertitudinea asociată cu măsurările efectuate cu ajutorul metodei UV-Vis pentru a evalua precizia rezultatelor.

Metoda HPLC

Metoda HPLC se aplică pe larg în analiza medicamentelor. Pentru validarea acesteia sunt recomandați parametrii de bază, precum:

- *Specificitate.* Una dintre cele mai importante caracteristici ale validării HPLC este asigurarea specificității metodei. Aceasta induce capacitatea metodei de a separa și a identifica compușii de interes dintr-un amestec complex. Se verifică dacă metoda poate distinge cu precizie analitul de alte substanțe coeluate.
- *Linearitate.* Se verifică dacă răspunsul detectorului HPLC este proporțional cu concentrația analitului. Acest lucru se realizează prin măsurarea răspunsului detectorului la concentrații cunoscute ale analitului și crearea unei curbe de calibrare liniare.
- *Precizie.* Se referă la reproductibilitatea rezultatelor. Aceasta poate fi evaluată prin măsurarea deviației standard a mai multor replicări ale aceleiași eșantion sau prin determinarea preciziei intermediare și a preciziei repetabilității.
- *Limita de detecție și limita de cuantificare.* Aceste valori reprezintă cele mai mici concentrații ale analitului care pot fi detectate și cuantificate în mod fiabil cu metoda HPLC. Determinarea acestor limite este esențială pentru a evalua sensibilitatea metodei.

- *Exactitate*. Se verifică gradul de apropiere a valorilor măsurate de valoarea reală a concentrației analitului. Aceasta poate fi efectuată prin analiza unor mostre de referință sau prin comparația cu alte metode de analiză.
- *Repetabilitate și reproductibilitate*. Repetabilitatea se referă la precizia în cadrul aceluiași laborator, folosind aceeași metodă și echipament, în timp ce reproductibilitatea se referă la precizia între laboratoare diferite.
- *Stabilitatea soluțiilor și a echipamentului*. Se verifică stabilitatea soluțiilor de test și a echipamentului în timp pentru a vă asigura că nu există schimbări semnificative care pot afecta rezultatele.
- *Robustețe*. Se testează capacitatea metodei de a produce rezultate consistente în ciuda variațiilor mici în condiții experimentale, cum ar fi variații în temperatură sau fluxul solventului.
- *Interferențe*. Se identifică orice interferențe posibile de la alte substanțe sau impurități care pot afecta rezultatele analizei.
- *Documentație adecvată*. Se fac înregistrări detaliate ale tuturor procedurilor de validare, datele obținute și protocolul de analiză, pentru a putea demonstra conformitatea metodei cu cerințele de calitate și reglementările aplicabile.

Validarea unei metode titrimetrice de dozare

Iată câteva caracteristici și aspecte cheie ale validării unei metode titrimetrice de dozare:

- *Specificitate*. Metoda titrimetrică trebuie să fie specifică pentru analitul sau compusul chimic de interes. Aceasta înseamnă că

metoda trebuie să reacționeze numai cu analitul țintă și să nu fie influențată de alte substanțe prezente în matricea de analiză.

- *Linearitate.* Validarea ar trebui să includă evaluarea linearității metodei. Aceasta implică testarea metodei pe o gamă de concentrații cunoscute ale analitului pentru a asigura că răspunsul instrumental sau volumul necesar de titrant variază liniar cu concentrația.
- *Precizie.* Se pot efectua teste de repetabilitate (reproductibilitate în interiorul aceluiași laborator) și de reproductibilitate (reproductibilitate între diferite laboratoare) pentru a evalua precizia metodei.
- *Acuratețe.* Pot fi utilizate surse de referință sau metode alternative pentru a verifica acuratețea metodei.
- *Sensibilitate.* Se determină dacă metoda poate detecta variații mici în concentrație. Cu cât o metodă este mai sensibilă, cu atât poate detecta concentrații mai scăzute ale analitului.
- Se determină Limita de detecție și limita de cuantificare.
- *Robustețe.* Se testează influența variațiilor mici ale condițiilor experimentale, cum ar fi temperatura, pH-ul și concentrația titrantului.
- *Verificarea curbei de titrare.* Validarea ar trebui să includă verificarea curbei de titrare și determinarea parametrilor critici, cum ar fi punctul de echivalență sau punctul final al titrării.

Abordarea practică a unui protocol general de validare a unei metode analitice

Procedura de validare presupune o descriere foarte riguroasă a tuturor etapelor de preparare a probelor, pregătire a utilajului și aparatajului folosit, modalitatea de executare a experiențelor. Pentru familiarizarea cu etapele de bază a validării unei metode instrumentale de analiză, se propune descrierea succintă a unui studiu de validare.

Studiul de validare a unei metode HPLC de dozare a izohidrafuralului și metiluracilului din unguent combinat

Scopul studiului este de a dezvolta și valida o metodă HPLC de determinare cantitativă a izohidrafuralului (figura 2) și metiluracilului (figura 3) din unguentul combinat.

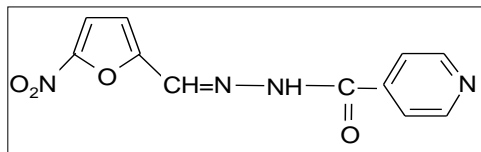


Figura 2. Structura chimică a izohidrafuralului

Materiale și metode

Medicamentul cercetat: Unguentul combinat cu conținut de izohidrafural și metiluracil; 100 g unguent conține: substanțe active: izohidrafural 0,1 g, metiluracil 4,0 g, excipienți: polietilenglicol 400, polietilenglicol 1500.

Substanțe de referință: izohidrafural (sintetizat în laborator, lot 00.01.112.10), metiluracil standard de farmacopee.

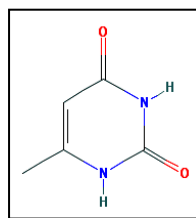


Figura 3. Structura chimică a metiluracilului

Aparatură:

- cromatograful Liquid Chromatograph Agilent 1220 Infinity LC Technologies,
- coloana cromatografică Nucleosil 100 C18, cu dimensiunile 4x150 mm, mărimea particulelor 10 µm;
- faza mobilă: amestecul de metanol și apă purificată în raportul 25:75;
- detecția UV-Vis la lungimea de undă de 260 nm;
- debitul fazei mobile: 1,0 ml/minut;
- temperatura coloanei cromatografice: +30°C.

Metodologia de lucru

Metoda HPLC este cel mai des utilizată pentru formele farmaceutice combinate. Având la bază mecanismul separării componentelor dintr-un amestec, permite identificarea și dozarea principiilor active în același timp. De asemenea pot fi detectate cu exactitate și impuritățile.

Tehnicile de lucru de obținere a soluțiilor necesare pentru validarea metodei:

Pregătirea soluției standard stoc de izohidrafural: 0,01 g (masă exactă) standard de lucru de izohidrafural se transferă într-un balon cotat de 100 ml. Se adăugă aproximativ 30 ml de fază mobilă și se agită până la dizolvare. Apoi se aduce până la cotă cu fază mobilă.

Pregătirea soluției standard stoc de metiluracil: 0,4 g (masă exactă) standard de metiluracil se transferă într-un balon cotat de 100 ml. Se adăugă aproximativ 30 ml de fază mobilă și se agită până la dizolvare. Apoi se aduce până la cotă cu fază mobilă.

Pregătirea probei placebo. Circa 1,0 g (masă exactă) placebo se transferă într-o ceașcă de porțelan, la care se adaugă 10 ml de fază mobilă și se încălzește la 30°C până la topire. Proba obținută se răcește, se filtrează prin filtru cu membrană (0,45 μm) și se transferă într-un balon cotat de 50 ml. Extracția se repetă de două ori cu câte 15 ml fază mobilă. Probele obținute se unesc cu prima extracție și se aduce la cotă cu fază mobilă. 5 ml din soluția obținută se trec într-un balon cotat cu capacitatea de 10 ml și se completează până la cotă cu fază mobilă.

Obținerea soluțiilor standard de calibrare pentru dreapta D_1 de determinare a liniarității pentru izohidrafural: se prepară 3 serii diferite de soluții, fiecare serie cu 5 niveluri de concentrație de soluții standard cu concentrațiile 8, 9, 10, 11 și 12 μg/ml în placebo diluat.

Obținerea soluțiilor standard de calibrare pentru dreapta D_2 de determinare a liniarității pentru izohidrafural: se prepară 3 serii diferite de soluții, fiecare serie cu 5 niveluri de concentrație de soluții standard cu concentrațiile 8, 9, 10, 11 și 12 μg/ml în fază mobilă (solventul soluției standard stoc de izohidrafural).

Obținerea soluțiilor standard de calibrare pentru dreapta D_1 de determinare a liniarității pentru metiluracil: se prepară 3 serii diferite de soluții, fiecare serie cu 5 niveluri de concentrație de soluții standard cu concentrațiile 320, 360, 400, 440 și 480 μg/ml în placebo diluat.

Obținerea soluțiilor standard de calibrare pentru dreapta D_2 de determinare a liniarității pentru metiluracil: se prepară 3 serii diferite de soluții, fiecare serie cu 5 niveluri de concentrație de soluții standard

cu concentrațiile 320, 360, 400, 440 și 480 $\mu\text{g/ml}$ în fază mobilă (solventul soluției standard stoc de izohidrafural).

Prepararea soluției probă: Circa 1,0 g (masă exactă) de unguent se transferă într-o ceașcă de porțelan, la care se adaugă 10 ml fază mobilă și se încălzește la 30°C până la topirea unguentului. Proba se răcește la temperatura camerei și se filtrează prin filtru de membrană (0,45 μm). Filtratul se transferă într-un balon cotat de 50 ml. Extracția se repetă de două ori cu câte 15 ml fază mobilă. Probele obținute se adaugă la prima extracție și se completează până la marcaj cu fază mobilă.

Pregătirea probei de exactitate 80% pentru izohidrafural. Într-un balon cotat cu capacitatea de 10 ml se plasează 2,5 ml soluție probă și 0,3 ml soluție standard stoc de izohidrafural. Se amestecă bine și se aduce la cotă cu fază mobilă.

Pregătirea probei de exactitate 100% pentru izohidrafural. Într-un balon cotat cu capacitatea de 10 ml se plasează 2,5 ml soluție probă și 0,5 ml soluție standard stoc de izohidrafural. Se amestecă bine și se aduce la cotă cu fază mobilă.

Pregătirea probei de exactitate 120% pentru izohidrafural. Într-un balon cotat cu capacitatea de 10 ml se plasează 2,5 ml soluție probă și 0,7 ml soluție standard stoc de izohidrafural. Se amestecă bine și se aduce la cotă cu fază mobilă.

Pregătirea probei de exactitate 80% pentru metiluracil. Într-un balon cotat cu capacitatea de 10 ml se plasează 2,5 ml soluție probă și 3,0 ml soluție standard stoc de metiluracil. Se amestecă bine și se aduce la cotă cu fază mobilă.

Pregătirea probei de exactitate 100% pentru metiluracil. Într-un balon cotat cu capacitatea de 10 ml se plasează 2,5 ml soluție probă și 5,0 ml soluție standard stoc de metiluracil. Se amestecă bine și se aduce la cotă cu fază mobilă.

Pregătirea probei de exactitate 120% pentru metiluracil. Într-un balon cotat cu capacitatea de 10 ml se plasează 2,5 ml soluție probă și 7,0 ml soluție standard stoc de metiluracil. Se amestecă bine și se aduce la cotă cu fază mobilă.

Pregătirea soluției de analizat pentru validarea preciziei metodei: 5 ml de soluție probă se transferă într-un balon cotat de 10 ml și se aduce la cotă cu fază mobilă.

Validarea metodei HPLC și prelucrarea rezultatelor

Specificitate. Se injectează pe rând în sistemul HPLC proba placebo și soluțiile standard ale substanțelor active. Se determină timpul de retenție pentru fiecare substanță medicamentoasă. Se va cerceta dacă în cromatograma soluției placebo se observă un pic cromatografic la același timp de retenție cu cel al izohidrafuralului sau metiluracilului. Dacă se atestă un pic suplimentar care deformează sau perturbă picul izohidrafuralului sau cel al metiluracilului atunci metoda nu este specifică.

Linearitate. Se injectează seriile de soluții pentru dreptele D₁ și dreptele D₂ ale izohidrafuralului și metiluracilului. Se înregistrează fiecare arie de pic cromatografic în dependență de serie, nivel de concentrație și nivel de replicare al fiecărui nivel de concentrație. Se trasează dreptele de calibrare (aria picului cromatografic *versus* concentrație) pentru fiecare dintre replicările unui nivel de

concentrație și, respectiv, pentru fiecare dintre cele 3 serii de date diferite. Se evaluează statistic liniaritatea pentru fiecare dintre cele 2 drepte ale izohidrafuralului și ale metiluracilului prin aplicarea testului C (omogenitatea varianțelor unor grupe de determinări), testului F (testarea validității dreptei și existenței unei pante semnificative), testului t (compararea pantelor și, respectiv, intercepțiile, de asemenea se verifică dacă dreptele validate trec prin origine).

Limita de detecție. Se determină prin injectarea repetată a soluțiilor de izohidrafural și metiluracil (în fază mobilă) până când raportul dintre semnalul analitic dat de picul cromatografic și zgomotul de fond este de 3. Limita de detecție poate fi de asemenea calculată prin formula (1).

Limita inferioară de cuantificare. Se determină prin injectarea repetată a soluțiilor de izohidrafural și metiluracil (în placebo și fază mobilă) până când raportul dintre semnalul analitic dat de picul cromatografic și zgomotul de fond este de 10. Limita de detecție poate fi de asemenea calculată prin formula (2).

Exactitate. Se măsoară ariile picurilor cromatografice pentru cele 3 niveluri și replicări corespunzătoare verificării exactității pentru soluțiile de izohidrafural și metiluracil preparate în placebo diluat. Concentrațiile regăsite se determină folosind ecuația curbei de calibrare D_2 . Validarea datelor de verificare a exactității se face aplicând testele C (omogenitatea varianțelor unor grupe de determinări) și F (de comparație a varianțelor intra-grup cu cele inter-grup). Se calculează regăsirea medie care trebuie să fie între limitele de 98 și 102%.

Precizie. Se măsoară ariile picurilor cromatografice pentru cele 3 serii de soluții ale izohidrafuralului și metiluracilului obținute în placebo diluat și se calculează concentrațiile corespunzătoare prin raportare la dreapta D₁. Analogic se efectuează și pentru celelalte 3 serii de izohidrafural și metiluracil obținute în fază mobilă, folosind ca referință dreapta D₂. Validarea datelor de verificare a preciziei se face aplicând testul C (omogenitatea varianțelor unor grupe de determinări). Se calculează coeficientul de variație corespunzător repetabilității *CVR* și cel al preciziei intermediare *CVR*, care trebuie să fie în ambele situații sub 2%.

Robustețe. Se determină prin variația condițiilor de cromatografiere: debitul fazei mobile cu ± 1 ml/min., cantitatea de metanol în faza mobilă cu $\pm 2\%$ și temperatura coloanei cu $\pm 5^{\circ}\text{C}$. Se calculează coeficientul de variație care trebuie să fie mai mic decât 2%.

SARCINI PENTRU LUCRUL INDIVIDUAL

În baza datelor experimentale de validare se vor efectua calculele și se vor completa fișele de lucru din *Anexele 1, 2, 3 și 4*.

PROBLEMA 1. Cercetați parametrul de validare *liniaritatea* pentru o metodă spectrofotometrică UV-Vis elaborată pentru dozarea unei substanțe medicamentoase la un prag de semnificație de 5%:

1.1. Dreapta de regresie liniară obținută cu forma farmaceutică reconstituită (D₁)

Nivele de C	X, μg/ml	Y, Absorbanța	$X - X_{med}$	$(X - X_{med})^2$	$Y - Y_{med}$	$(Y - Y_{med})^2$	$(X - X_{med})^*$ * $(Y - Y_{med})$
60%							
80%							
100%							
120%							
140%							
$\bar{X}_{med} =$		$\bar{Y}_{med} =$		Suma =		Suma =	Suma =

1.2. Dreapta de regresie liniară obținută cu substanța de referință (D₂)

Nivele de C	X, μg/ml	Y, Absorbanța	$X - X_{med}$	$(X - X_{med})^2$	$Y - Y_{med}$	$(Y - Y_{med})^2$	$(X - X_{med})^*$ $* (Y - Y_{med})$
60%							
80%							
100%							
120%							
140%							
$X_{med} =$		$Y_{med} =$		Suma =		Suma =	Suma =

PROBLEMA 2. Cercetați parametrul de validare *exactitatea* pentru o metodă spectrofotometrică UV-Vis elaborată pentru dozarea unei substanțe medicamentoase la un prag de semnificație de 5%, fiind determinată la 3 nivele de concentrație: 80%, 100% și 120% prin metoda adaosului standard, iar concentrația teoretică a substanței active se va calcula folosind ecuația regresiei liniare stabilite la parametrul de liniaritate în Problema 1:

Nivele de concentrație	A	C _p	C _a	C _t	Randamentul recuperării, % $R = [(C_t - C_p)/C_a] * 100\%$
80%					
100%					
120%					
Media, %					

PROBLEMA 3. Cercetați parametrul de validare *repetabilitatea* pentru o metodă spectrofotometrică UV-Vis elaborată pentru dozarea unei substanțe medicamentoase la un prag de semnificație de 5%, iar concentrația teoretică a substanței active se va calcula folosind ecuația regresiei liniare stabilite la parametrul de liniaritate în Problema 1:

N/o	Absorbanța, Y	Concentrația, X	$X - X_{\text{mediu}}$	$(X - X_{\text{mediu}})^2$
1.				
2.				
3.				
4.				
5.				
6.				
7.				
		$X_{\text{mediu}} =$		Suma =

PROBLEMA 4. Cercetați parametrul de validare *robustețea* pentru o metodă spectrofotometrică UV-Vis elaborată pentru dozarea unei substanțe medicamentoase, dacă cercetările s-au efectuat prin variația cu ± 1 nm a lungimii de undă maxime de absorbție a luminii de către probă (373 nm) la un prag de semnificație de 5%:

Lungimea de undă	Absorbanța, Y_{ij}	$Y_{ij} - Y_{\text{mediu}}$	$(Y - Y_{\text{mediu}})^2$
		$Y_{\text{mediu}} =$	Suma =

BIBLIOGRAFIE

1. Achimaș C. A. Metodologia cercetării științifice medicale, Editura Medicală Universitară „Iuliu Hațieganu” Cluj-Napoca, 1999.
2. Bibire, N., Vieriu, M., Panainte, A., Agoraei, L., Uncu, L. et al. A new High Performance Liquid Chromatographic Analysis Method for Ciprofloxacin. In: Revista de chimie. 2015, nr. 9(66), pp. 1463-1466. ISSN 0034-7752. (IF: 0,956).
3. Bojiță M., Roman L., Săndulescu R., Oprean R. Analiza și Controlul medicamentelor, vol. I. - Cluj-Napoca: Editura Intelcredo, 2003.
4. Bojiță M., Roman L., Săndulescu R., Oprean R. Analiza și Controlul medicamentelor, vol. II. - Cluj-Napoca: Editura Intelcredo, 2003.
5. British Pharmacopoeia. – London, 2009.
6. Chan C.C., Lam H., Lee Y.C., Zhang X. Analytical method validation and instrument performance verification, Wiley Interscience, 2004.
7. Colectiv de autori: Guide de validation analytique. Rapport d'une commission SFSTP. STP Pharma Pratiques, 1992, 2(4), p. 205-239.
8. Dehelean C. A., Danciu C., Simu G. M., Șoica C. M. Elemente de metodologia cercetării științifice, Ed. Hippocrate, Timișoara, 2013.
9. Donici E. Elaborarea și validarea metodei spectrofotometrice în ultraviolet și vizibil de dozare a fluocinolonului acetonid dintr-un

- unguent combinat: studiu experimental. În: *Moldovan Journal of Health Sciences. Revista de Științe ale Sănătății din Moldova*. 2017, vol. 13, nr.3, pp. 53-58. ISSN 2345-146.
10. DONICI, E. Elaborarea metodei spectrofotometrice UV-VIS de determinare cantitativă a izohidrafuralului, metiluracilului și benzocainei din unguentul combinat. În: *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științe Medicale*. Chișinău, 2016, 1(50), pp. 245-248. ISSN 1857-0011.
 11. Ermer J., Miller J. H. McB. *Method Validation in Pharmaceutical Analysis*, Wiley-VCH, 2005.
 12. *European Pharmacopoeia - 8th edition*. Council of Europe, 67075 Strasbourg Cedex, France – 2013.
 13. *Farmacopea Română. Ediția X-a* –București: Editura medicală, 1993.-1315 p.
 14. Imre S., Ion V., Muntean D.-L. *Ghid practic de metodologia cercetării în științele farmaceutice și conexe*, Târgu Mureș: University Press, 2019.
 15. Kumar R. *Research Methodology. A Step-by-Step Guide for Beginners*, Sage Publications, 2005.
 16. Mullins E. *Statistics for the Quality Control Chemistry Laboratory*, The Royal Society for Chemistry, 2003.
 17. Oprean R., Rozet E., Dewe E., Boulanger B., Hubert Ph. *Ghid de validare a procedurilor analitice cantitative*, Editura Medicală Universitară Iuliu Hațieganu, Cluj-Napoca, 2007.

18. Popa L. Elemente de metodologia cercetării științifice în domeniul farmaceutic, Ediția a II-a revizuită și adăugită, Editura Printech București, 2005.
19. Roman L., Bojiță M., Săndulescu R., Muntean D.L. Validarea metodelor analitice, Editura Medicală, 2007.
20. Rus, L.M., Donici, E., Valica, V., Prisacari, V., Tomuță, I., Șepeli, D., Hegheș S.C., Iuga, A.C., Uncu, L. Development, physical-chemical characterization and *in vitro* antibacterial activity evaluation of a fixed-dose combination isohydrofural-methyluracil hydrophilic ointment. *Farmacia*. 2019, 67(5), 857-865. DOI:10.31925/farmacia.2019.5.15. ISSN (p) 0014-8237, ISSN (e) 2065-0019.
21. Themistocles P. H., Christian G. D., Koupparis M. A., Macheras P. E. Quantitative Calculations in Pharmaceutical Practice and Research, VCH Publishers, New York, 1993.
22. Uncu, L., Donici, E., Valica, V., Vișlouh, O., Gonciar, V., Parii, S. Development and validation of an assay method for ciprofloxacin hydrochloride determination in combination ear drops. *Chemistry Journal of Moldova*. 2019, DOI: <http://dx.doi.org/10.19261/cjm.2019.607>. ISSN (p) 1857-1727, ISSN (e) 2345-1688.
23. Uncu, L., Evtodienco, V., Mazur, E., Donici, E., Valica, V. Validation of the spectrophotometric method for the dosing of some combined capsules. *Moldovan Medical Journal*. October, 2021, 64(4), 2021. pp. 10-16. ISSN 2537-6373 (Print). ISSN

- 2537-6381 (Online) Disponibil: DOI:
<https://doi.org/10.52418/moldovan-med-j.64-4.21.02> .
24. Uncu, A. Development and validation of the high-pressure liquid chromatographic method for the quantitative determination of propylthiothiadiazole. *Moldovan Medical Journal*. September 2020;63(3):3, 32-37. DOI: <https://10.5281/zenodo.3958549>
25. Uncu, L., Vîrlan, V., Mazur, E., Donici, E., Valica, V. Validarea metodei spectrofotometrice de dozare a unor picături auriculare combinate. In: *Materialele Congresului Național de Farmacie*, Ed. XVIII-a, 15-17 septembrie, 2021, Oradea, România. Oradea: Editura Universității din Oradea, 2021, p. 28. I-SBN 978-606-10-2144-4. Disponibil: https://cnfronline.ro/images/Brosura_Congres_CNFR_2021_ISB N.pdf
26. Valica V., Uncu L., Donici E., Treapițina T., Mazur E., Ștefanet T. *Chimie farmaceutică; sub redacția: Vladimir Valica. Volumul I.*, Chișinău: Garomont-Studio, 2022 -330 p. -ISBN 978-9975-162-37-1
27. Vieriu, M., Tantar, G., Apostu, M., Panainte, A.D., Agoroaei, L., Uncu, L. et al. A New Spectrometric Method for Quantitative Determination through Molecular Absorption of Lisinopril. In: *Revista de chimie*. 2015, nr. 10(66), pp.1563-1566. ISSN 0034-7752. (IF 0,956).
28. European Medicines Agency ICH: Q2 (R1) Validation of analytical procedures: Text and methodology step, 1995. URL:

- <https://database.ich.org/sites/default/files/Q2%28R1%29%20Guideline.pdf> (accesat la 15.10.2022).
29. European Medicines Agency: VICH GL1 Validation of analytical procedures: definition and terminology, 1998. URL: <https://database.ich.org/sites/default/files/Q2%28R1%29%20Guideline.pdf> (accesat la 15.10.2022).
30. Introduction to method validation. Disponibil la: <https://www.lgcgroup.com/media/1509/introduction-to-method-validation.pdf> [accesat la 12.11.2022].

Anexa 1. Fișa de lucru

Validarea unei metode de dozare. Rezultatele studiului parametrului „Liniaritate”

D_1 – dreapta de regresie liniară obținută cu soluții cu placebo marcat

D_2 – dreapta de regresie liniară obținută cu soluții standard în solvent

Nr.	Parametrul/Testul statistic	Dreapta D_1	Dreapta D_2	Valoarea critică a parametrului statistic (risc de 5%)	Concluzii
A.	Parametrii ecuației drepte de calibrare:				Cele două drepte descriu/nu descriu o dependență liniară
1.	Domeniul de concentrații, mg/ml				
2.	Panta	$a_1 =$	$a_2 =$		
3.	Intercepția	$b_1 =$	$b_2 =$		
4.	Coeficientul de corelare	$r_1 =$	$r_2 =$	0,99 – 1,00	
B.	Testul de verificare a omogenității variantelor (test C – Cochran)	$C_{exp} =$	$C_{exp} =$	$C(0,05;5;2) = 0,8412$	Variantele grupelor de determinare sunt/nu sunt omogene
C.	Test de existență a unei pante semnificative (test F – Fisher)	$F_{exp} =$	$F_{exp} =$	$F(0,05;1;13) = 4,67$	Panta caracterizează/nu caracterizează o dependență liniară
D.	Test de validitate a dreptei de regresie liniară (compară erorile de ajustare cu cele experimentale: test F – Fisher)	$F_{exp} =$	$F_{exp} =$	$F(0,05;3;10) = 3,71$	Ajustările sunt/nu sunt valide; dreapta este/nu este validă

E.	Test de comparare a pantelor dreptelor (testul t)	$t_{exp} =$		$t(0,05;26) = 2,056$	Cele 2 pante nu diferă/ diferă semnificativ
F.	Test de comparare a ordonatelor la origine cu 0 (test t)	$t_{exp} =$	$t_{exp} =$	$t(0,05;13) = 2,16$	Ordonata la origine diferă/nu diferă semnificativ de 0
	Test de comparare a ordonatelor la origine (test t)	$t_{exp} =$		$t(0,05;26) = 2,056$	Cele 2 ordonate la origine diferă/nu diferă semnificativ

Anexa 2. Fișa de lucru

Validarea unei metode de dozare. Rezultatele studiului parametrului „Exactitate”

Parametrul/Testul statistic	Rezultatele obținute	Valoarea critică a parametrului statistic (risc de 5%)	Concluzii
Domeniul de concentrații, mg/ml			
Testul de verificare a omogenității variațiilor intra-grup (test C – Cochran)	$C_{exp} =$	$C(0,05;3;2) = 0,9669$	Variațiile intra-grup sunt/nu sunt omogene
Test de validitate a mediei (test F – Fisher)	$F_{exp} =$	$F(0,05;2;6) = 5,14$	Exactitatea (regăsirea) medie a metodei este/nu este validă
Regăsirea medie, %	$R =$	$[98 \div 102]$	Exactitatea (regăsirea) medie a metodei se încadrează/nu se încadrează în domeniul de acceptanță

Anexa 3. Fișa de lucru**Validarea unei metode de dozare. Rezultatele studiului parametrului „Precizie”**

Parametrul/Testul statistic	Rezultatele obținute	Valoarea critică a parametrului statistic (risc de 5%)	Concluzii
Nivelul de concentrație de lucru, mg/ml			
Testul de verificare a omogenității variațiilor (test C – Cochran)	$C_{exp} =$	$C(0,05;3;5) = 0,7457$	Variațiile sunt/nu sunt omogene
Coeficientul de variație a repetabilității, %	$CV_r =$	$[-2 \div 2]$	Metoda este/nu este precisă
Coeficientul de variație a preciziei intermediare, %	$CVR =$	$[-2 \div 2]$	

Anexa 4. Fișa de lucru**Validarea unei metode de dozare. Rezultatele studiului parametrului „Robustețe”**

Lungimea de undă	Absorbanța, Y_{ij}	Abaterea standard	Coeficient de variație, %
		$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (Y - Y_{mediu})^2}{N - 1}}$	$CV\% = \frac{s}{Y_{mediu}} \cdot 100\%$ $[-2 \div 2]$
Metoda este/nu este robustă			