

## ПРИГОВОР

На РЕЦЕНЗИЈА НА ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА СО НАСЛОВ „РАЗВОЈ И ВАЛИДАЦИЈА НА МЕТОД БАЗИРАН НА ТЕЧНА ХРОМАТОГРАФИЈА ЗА ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА МЕЛОХИСАМ И НЕГОВИ СРОДНИ СУПСТАНЦИИ ПРИ ИСПИТУВАЊЕ НА СТАБИЛНОСТ ВО РАСТВОР ЗА ИНЈЕКТИРАЊЕ“, ПРИЈАВЕНА НА ФАКУЛТЕТ ЗА МЕДИЦИНСКИ НАУКИ, УНИВЕРЗИТЕТ „ГОЦЕ ДЕЛЧЕВ“ – ШТИП објавена во Универзитетски билтен со број 383 објавен на веб страната на Универзитет Гоце Делчев – Штип на ден 02.03.2026 година.

Со Одлука број 0206-192/9 од 20.2.2026 година, донесена на 111. седница на Наставно-научниот совет на докторски студии на Кампус 3, Факултет за медицински науки, Универзитет „Гоце Делчев“ во Штип, формирана е Комисија за оценка и одбрана на докторската дисертација со наслов „Развој и валидација на метод базиран на течна хроматографија за определување на meloxicam и негови сродни супстанции при испитување на стабилност во раствор за инјектирање“, на англиски јазик “Development and validation of a liquid chromatography-based method for determination of meloxicam and its related substances in injection solution stability testing”, пријавена и изработена од м-р спец. Дино Карпичаров, студент на трет циклус студии на студиската програма Фармацевтски науки, како редовен студент со број на индекс 31169, во следниов состав:

- проф. д-р Марија Дарковска-Серафимовска, претседател;
- проф. д-р Биљана Ѓорѓеска, член (ментор);
- проф. д-р Јасмина Тониќ-Рибарска, член (екстерен ментор);
- проф. д-р Зорица Арсова-Сарафиновска, член;
- проф. д-р Емилија Јаневик-Ивановска, член.

Поднесенiот приговор се однесува на огромен број научни недоследности, компромитиран интегритет на податоци и регулаторна нерелевантност во докторската дисертација. Станува збор за податоци објавени во научни трудови кои тематски и методолошки се директно поврзани со предметот на истражување и практично претставуваат научна потврда за вредноста на самиот докторски труд. Поради нераскинливата поврзаност помеѓу објавените научни трудови и самата докторска тема, од суштинско значење е да се зачува интегритетот на податоците и регулаторните барања. Секое отстапување од вистинитоста на податоците во трудовите директно ја урива довербата во целиот труд.

Како доктор на науки, сметам дека е моја професионална должност да укажам дека без јасна следливост, точност на резултатите и почитување на регулаторните барања не можеме да зборуваме за валиден научен придонес. Иако трудовите поминале низ процесот на меѓународна рецензија, тоа не ја исклучува потребата од суштинска проверка на сурови податоците во рамките на оваа докторска тема. Знаеме дека рецензентите во списанијата често немаат увид во изворните мерења и се потпираат на етиката на авторот. Токму затоа, мојот приговор не е напад врз списанијата, туку апел до Вас како комисија и дел од матичната институција. Затоа, откриените недоследности и нарушените регулаторни барања мора да бидат сериозно разгледани токму од оваа

Комисија, која е последен гарант за квалитетот на докторската титула и последна линија на одбрана на научната вистина пред да се издаде една докторска титула.

Рецензентската комисија во нејзината рецензија директно посочува, цитат од рецензијата “Научната релевантност и валоризација на резултатите се потврдени и преку објавени рецензирани научни трудови во национални и меѓународни списанија, како и преку учество на научни собири, што укажува на нивната препознаеност и прифатеност од пошироката научна заедница.

Ова е во согласност со исполнетоста на законските услови за пристапување кон одбрана на докторската дисертација, имајќи предвид дека кандидатот има објавени трудови кои тематски и методолошки се директно поврзани со предметот на истражување и претставуваат научна валоризација на дел од резултатите од докторскиот труд:

1. **Karpicarov, D.**, Mitrevska, I., Manchevska, B., Apostolova, P., Tonic Ribarska, J., Gjorgjeska, B. (2026). Software-Assisted Analytical Quality by Design for Stability-Indicating Method Development: Integration of DoE and Predictive Retention Modeling Using MODDE® and DryLab®. *Macedonian Pharmaceutical Bulletin*, 72(2):3–15. doi: 10.33320/maced.pharm.bull.2026.72.02.001. [https://bulletin.mfd.org.mk/volumes/Volume%2072\\_2/72\\_2\\_002.pdf](https://bulletin.mfd.org.mk/volumes/Volume%2072_2/72_2_002.pdf). Трудот е уредно депониран во матичниот репозиториум: <https://eprints.ugd.edu.mk/37279/>
2. **Karpicarov, D.**, Mitrevska, I., Apostolova, P., Arev, M., Arsova-Sarafinovska, Z., Darkovska Serafimovska, M., Dražić, B., Tonic Ribarska, J., Gjorgjeska, B. (2025). Estimation of Measurement Uncertainty Using Top-Down and Bottom-Up Approaches for Accurate Content Determination of Meloxicam in Injectable Dosage Forms. *Arhiv za farmaciju*, 75(6):493–507. doi: 10.5937/arhfarm75-63142. <https://aseestant.ceon.rs/index.php/arhfarm/article/view/63142/29623>. Трудот е уредно депониран во матичниот репозиториум: <https://eprints.ugd.edu.mk/37126/>

Врз основа на оваа констатација на комисијата - дека трудовите се клучни за научната валоризација на докторската тема - ги презентирам следниве факти кои укажуваат на сериозна научна неусогласеност на податоците и нарушување на регулаторните барања во трудовите.

Научниот труд наведен од страна на Рецензентската комисија под наслов “Estimation of Measurement Uncertainty Using Top-Down and Bottom-Up Approaches for Accurate Content Determination of Meloxicam in Injectable Dosage Forms”, е јавно достапен во репозиториумот на Универзитетот „Гоце Делчев“ – Штип. Самата содржина на овој труд е фокусирана на мерната несигурност преку примена на двата клучни пристапа: top-down (одозгора надолу – вака е наведено во рецензијата) и bottom-up (одоздола нагоре – вака е наведено во рецензијата)

Она што е методолошки најрелевантно во овој труд е фактот што кандидатот директно се повикува на сопствени претходни истражувања. Конкретно, во повеќе наврати се цитира трудот објавен во 2023 година во списанието “KNOWLEDGE – International Journal Vol.57.4, со наслов “DEVELOPMENT AND VALIDATION OF HPLC METHOD FOR CONTENT DETERMINATION OF MELOXICAM IN INJECTIONS” кој се однесува на развојот и валидацијата на методот. Насловот на овој труд е во директна корелација со насловот на

докторската тема на кандидатот „Развој и валидација на метод базиран на течна хроматографија за определување на мелоксикам и негови сродни супстанции при испитување на стабилност во раствор за инјектирање“, како и со воспоставените цели на докторскиот труд што е наведено и во рецензијата на комисијата. Цитат од рецензијата “Целите на истражувачката работа се јасно, прецизно и логично дефинирани и произлегуваат директно од поставената проблематика и од прегледот на релевантната литература. Главната цел на докторската дисертација е развој, оптимизација и валидација на HPLC методи за определување на содржината, односно определување на meloxicam во присуство на неговите сродни супстанции. Притоа, оваа цел е јасно формулирана, научно оправдана и целосно остварлива.”

Ваквото цитирање не е само формалност, туку јасен индикатор дека резултатите за мерната несигурност директно произлегуваат од претходно утврдените валидациони параметри. Токму тука се воспоставува клучната методолошка следливост во научното работење на кандидатот. Меѓутоа, за да се потврди веродостојноста на овој процес, неопходно е да се изврши детална анализа на примарниот труд од 2023 година. Во продолжение, преку неколку аргументирани точки, укажувам на сериозни недоследности во развојот и валидацијата на методот, кои ја доведуваат во прашање целата натамошна научна конструкција.

#### **1. Кандидатот ги навел големината на порите (100 Å) и големината на честичките (5 µm), но свесно ги изоставил димензиите на колоната**

Должината на колоната (L) и внатрешниот дијаметар (dc) се критични параметри на методот (Critical Method Parameters - CMP). Со скривањето на должината на колоната го спречува пресметувањето на односот L/dp (должина брз големина на честички). Овој однос е клучниот индикатор за моќта на резолуција на колоната. Без него, ниту еден друг научник не може да ја потврди соодветноста на перформансите (System Suitability) или да избере еквивалентна колона. Ова е директна повреда на принципот на научна репродуктивност.

Бидејќи должината не е наведена, лабораторијата не може да ги примени дозволените прилагодувања според USP <621>. Ова го прави методот технички неусогласен. Ако не се знае почетното L, не може да се пресмета дали новата колона е во дозволеениот опсег од -25% до +50%. Ова е сериозен пропуст кој го прави методот нелегитимен за примена во фармацевтска стабилност.

Цитати од Американска и Европска фармакопеа (цитатот го пренесувам изворно на јазикот на кој е објавен и сите понатамошни цитати од регулаторни тела)

**USP General Chapter <621> Chromatography, Section: System Suitability / Interpretation of Chromatograms:** "For isocratic separations, the ratio of the column length (L) to the particle diameter (dp) is used. The ratio L/dp must be constant, or within the range from -25% to +50% of the prescribed value."

**Ph. Eur. General Chapter 2.2.46. Chromatographic Separation Techniques, Section: Adjustment of Chromatographic Conditions:** "Isocratic elution: the ratio of the column length (L) to the particle diameter (d) is constant or within the range -25% to +50%."

Должината на колоната директно влијае на задржувањето на анализот. Со криење на димензиите, кандидатот се обидува да го сокрие фактот дека колоната е веројатно прекратка за да обезбеди соодветно задржување ( $k'$ ) на Мелоксикам, што резултира со елуирање во мртвиот волумен.

Изоставувањето на димензиите на колоната во делот за материјали и методи не е само технички пропуст, туку суштинско прекршување на фармакопејските стандарди USP <621> и Ph. Eur. 2.2.46. Без овој критичен параметар (CMP), методот е научно нерепродуктивен и невозможно е да се изврши легитимно прилагодување на хроматографските услови. Ваквиот пристап го оневозможува секој обид за независна верификација на перформансите на методот, што е во директна спротивност со принципите на Добрата лабораториска пракса (GLP) и интегритетот на научните податоци.

**2. Кандидатот наведува дека Мелоксикамот има подобра растворливост во метанол отколку во вода, но веднаш потоа додава, дека само во мала количина може целосно да се раствори.**

Ова е фундаментална контрадикторност. Доколку Мелоксикамот е слабо растворлив во метанол, одлуката да се додаде само половина од волуменот (25 ml) пред сонификација е критична грешка. Со ограничување на волуменот на растворувачот, кандидатот работи блиску до или над границата на сатурација. Сонификацијата во недоволен волумен не гарантира тотална обновливост (recovery), туку може да доведе до преципитација или нецелосно растворање на активната супстанца, што директно го лажира крајниот резултат на анализата

Кандидатот применува сонификација во траење од 20 минути, процес кој е егзотермен и значително ја зголемува температурата на растворувачот.

Метанолот има екстремно висок коефициент на термичка експанзија (термичка експанзија ( $1.1 \times 10^{-3} \text{ K}^{-1}$ ) и ниска точка на вриење. Дополнувањето до ознаката веднаш по сонификација (додека растворот е топол) е кардинална волуметриска грешка. Кога растворот ќе се олади до 20 °C, волуменот ќе се намали, што резултира со повисока концентрација од пресметаната. Ако колбата не е херметички затворена за време на тие 20 минути сонификација, испарувањето на метанолот дополнително ја зголемува концентрацијата на Мелоксикамот.

Стандардите налагаат дека постапката за подготовка на примерокот мора да биде прецизна и репродуктивна за да се осигура дека секоја анализа го одразува вистинскиот состав на лекот. Поради термичката нестабилност на волуменот на метанолот и

недоволниот почетен волумен за растворање, оваа постапка не може да се смета за робусна. Секое отстапување во температурата на ултразвучната бања ќе даде различен резултат, што го прави методот нерепродуктивен во друга лабораторија.

Цитати од американска фармакопеа и ICH (International Council for Harmonisation)

**USP General Chapter <1225> Validation of Compendial Procedures:** "The sample preparation procedure must be proven to be robust. Factors such as solvent volume and extraction time must be controlled to ensure total recovery of the analyte."

**ICH Guideline Q2 (R2) on Validation of Analytical Procedures:** "The analytical procedure should be described in sufficient detail to allow a trained analyst to reproduce it... Significant changes in solvent temperature or volume during preparation must be avoided to prevent bias in the final result."

Постапката за подготовка на растворите опишана од кандидатот е неисправна и содржи логички контрадикции. Користењето на сонификација од 20 минути со метанол во полупразна колба воведува неконтролирани грешки од термичка експанзија и испарување, што директно води до вештачко зголемување на измерената концентрација. Вакиот пристап е во директна спротивност со USP <1225> и принципите на Добрата лабораториска пракса (GLP), бидејќи го компромитира најкритичниот дел од анализата – прецизното пренесување на масата на анализот во мерлив волумен.

### 3. Кандидатот во својот труд наведува:

"Currently, the internationally recognized pharmacopoeias use a gradient method for content determination of Meloxicam in injections, which can be time-consuming and not as easy as the isocratic elution method to perform. To develop a simpler and faster isocratic method... HPLC with UV/Vis detection was used."

Одлуката свесно да се напушти градиентниот метод пропишан во официјалните фармакопеи (USP/BP/Ph. Eur.) во корист на „поедноставен“ изократски метод претставува методолошки регрес. Фармакопејските методи се дизајнирани со градиентна елуирање за да се обезбеди селективност помеѓу лекот и неговите деградациони производи (Stability-Indicating). Кандидатот не нуди научен доказ дека неговиот изократски метод ја задржува истата моќ на раздвојување, туку брзината ја става пред научната прецизност.

Цитати од американска фармакопеа и ICH (International Council for Harmonisation)

**ICH Q2(R2), Section 3.1.1 (Specificity):** > "Specificity is the ability to assess unequivocally the analyte in the presence of components which may be expected to be present. Typically these might include impurities, degradants, matrix, etc."

**USP <1225> (Validation of Compendial Procedures):** "Users of analytical methods described in USP are not required to validate the accuracy and reliability of these methods, but merely to

verify their suitability under actual conditions of use. [...] If a category I or category II analytical procedure is used as an alternative to the compendial procedure, the alternative procedure must be fully validated and must be shown to give results equivalent to or better than the compendial procedure."

#### 4.Изборот на pH го објаснува на следниов начин:

"Meloxicam has two pKa values, 1.2 and 4.2. At a pH of 3.1, Meloxicam is mostly in its ionized form, which increases its solubility in the mobile phase and improves its retention time on the column."

Ова тврдење содржи фундаментална грешка во разбирањето на HPLC. Доколку Meloxicamот е во јонизирана форма како што тврди кандидатот, неговата поларност се зголемува, што во HPLC (RP-18 колона) доведува до намалено, а не подобро ретенционо време (retention time). На pH 3.1 (што е помеѓу pKa1 1.2 и pKa2 4.2), Meloxicamот не е „целосно јонизиран“, туку се наоѓа во својата цвистер-јонска форма. Изборот на pH 3.1 без соодветен пуфер, туку само со оцетна киселина, доведува до нестабилен систем каде мала промена во pH (поради apparent pH (привидна pH) измерена во мешавина) ќе предизвика огромни поместувања на пикот. Кандидатот наведува дека pH вредноста од 3.1 е прилагодена со оцетна киселина откако се измешани ацетонитрилот и водата во сооднос 60:40. Доколку друг аналитичар го подготви истиот раствор, но ја мери pH вредноста само во водната фаза (како што е правилно), ќе добие сосема поинакви хроматографски резултати, иако „на хартија“ методот изгледа исто. Ова директно ја уништува робусноста и интермедиерната прецизност.

Неуспехот да се разбере хемиската интеракција на pH и pKa значи дека прилагодувањата за се постигне саканото раздвојување се на базираат само на претпоставки и тоа грешни. Неправилното толкување на pKa вредностите и ефектот врз ретенцијата директно ја загрозува интермедиерната прецизност на методот. Критичен пропуст во трудот на кандидатот е занемарувањето на фактот дека интермедиерната прецизност е директно зависна од робусноста на методот.

Цитати од американска фармакопеа и ICH (International Council for Harmonisation)

#### USP <621> (Chromatography), Mobile Phase Section:

"The pH of the mobile phase is that of the aqueous component. [...] For a given chromatography, the composition of the mobile phase, the column, and the temperature are adjusted to achieve the desired separation."

USP <621> (Chromatography), Physical Parameters: "The pH of the mobile phase is that of the aqueous component. Any adjustments should be made to the aqueous component before mixing it with the organic solvents. The pH of the mixture of the aqueous and organic

components is not controlled and should not be measured, as the values obtained are not reproducible."

**ICH Q2(R2), Section 3.3.2 (Intermediate Precision):**

"The objective of intermediate precision is to verify that the analytical procedure will provide the same results when performed by different analysts, on different days, or with different equipment within the same laboratory."

**ICH Q2(R2), Section 3.1.2 (Robustness):**

"The evaluation of robustness should be considered during the development phase and should show the reliability of an analysis with respect to deliberate variations in method parameters. [...] The robustness study should be used to establish system suitability parameters to ensure that the validity of the analytical procedure is maintained whenever used."

**5.Кандидатот го оправдува високиот сооднос на Ацетонитрил (60:40) со следново:**

"This ratio was chosen because the analyzed preparation is mono-component and it is advantageous for the peak to appear earlier, without any significant delay."

Овој пристап е неприфатлив за докторска тема која претендира да биде научно валидна. „Брзото појавување“ на пикот значи дека тој елуира во областа на празен (мртов) волумен на колоната. Ова е критична грешка бидејќи се јавуваат интерференци. Во оваа област елуираат сите онечистувања кои не се задржуваат на колоната. Кандидатот свесно ја елиминира способноста на методот да ги раздвои поларните деграданти, што е суштина на Stability-Indicating Method.

Аргументацијата на кандидатот за развој на 'поедноставен' метод се темели на погрешни хемиски претпоставки за рКа вредностите на Meloxicam и свесно занемарување на фармакопејските стандарди за селективност. Наместо да докаже дека методот е соодветен за следење на стабилност, кандидатот го оптимизирал системот за брзина, со што го компромитирал неговиот научен интегритет

**Цитати од американска фармакопеа и ICH**

**ICH Q2(R2), Section 3.1.1 (Specificity - Separation):**

"For the chromatographical procedures, representative chromatograms should be used to demonstrate specificity and individual components should be appropriately identified. [...] Critical separations should be investigated at the appropriate level."

**ICH Q1A(R2) (Stability Testing), Section 2.1.1:**

"Stability-indicating methods should be validated to be able to monitor the change in chemical, physical, and microbiological properties of the drug substance."

**6. Кандидатот наведува дека точноста е испитувана на три различни нивоа од 130%, 150% и 180% од работната концентрација:**

"To determine the accuracy of the analytical method, known quantities of the standard solution were added to the sample solution to create three concentration levels (130%, 150%, and 180% of the working concentration)."

Изборот на концентрации е во директна спротивност со сите меѓународни препораки за валидација на методи за одредување содржина. Стандардната пракса на ICH и USP наложува опсегот да биде симетричен околу работната точка (100%), најчесто од 80% до 120%. Со тестирање само на екстремно високи концентрации (над 130%), кандидатот свесно го избегнал испитувањето на методот во реалниот работен опсег, со што резултатите за точност се научно и регулаторно неважечки.

**Цитати од американска фармакопеа и ICH**

**ICH Q2(R2), Section 3.2.2 (Recovery):**

"Accuracy should be assessed using a minimum of 9 determinations over a minimum of 3 concentration levels covering the specified range (e.g., 80, 100 and 120% for the assay of a drug substance)."

**USP <1225> (Validation of Compendial Procedures):**

"For the assay of a drug substance or a finished product, the range is normally from 80% to 120% of the test concentration."

**7. Присуство на постојан системски превид (Systematic Bias)**

Анализата на Табела 1 покажува дека сите просечни вредности за обновливост се постојано над 100% (101.26%, 100.91% и 101.62%).

Ова не е случајна статистичка варијација, туку јасен доказ за системска грешка (Systematic Bias). Просечната вредност од 101.26% кај првото ниво е во точна корелација со грешките во подготовката на мобилната фаза и pH вредноста за кои веќе претходно пишував. Во аналитиката на лекови, конзистентно високи вредности на обновливост над 101% укажуваат на тоа дека методот систематски ја преценува содржината на лекот, што може да доведе до лажно позитивни резултати при контрола на квалитет.

**Цитати од американска фармакопеа и ICH**

**ICH Q2(R2), Section 3.2.1 (Accuracy):**

"Accuracy should be reported as percent recovery by the assay of known added amount of analyte in the sample or as the difference between the mean and the accepted true value together with the confidence intervals."

#### **USP <1210> (Statistical Concepts in Assay Development):**

"Systematic error, or bias, is the difference between the expectation of the test results and an accepted reference value. Accuracy is the closeness of agreement between the value which is accepted either as a conventional true value or an accepted reference value and the value found."

Бидејќи претходно пишував дека пикот елуира премногу рано, во близина на празниот (мртвиот) волумен, постои голема веројатност дека високиот процент на обновливост (над 101%) се должи на ко-елуирање на онечистувањата од матриксот (растворувачи+ексципиенси+онечистувања) кои се „собираат“ во истата ретенциона точка со Meloxicam. Доколку методот не е специфичен во зоната на празниот (мртвиот) волумен, UV детекторот ја мери вкупната апсорбанца на Meloxicam плус заедно сите онечистувања што елуираат на почетокот. Тоа резултира со лажно висока точност, што е токму она што го гледаме во табелата на кандидатот.

#### **8. Кандидатот наведува дека користел само три инјекции од стандардниот раствор за евалуација на повторливост**

"Three consecutive injections were performed for the standard solution, and six consecutive injections were performed for the sample solution"

Ова е директно кршење на правилата за System Suitability Testing (SST). Стандардот служи за да се потврди дека инструментот (HPLC) работи стабилно пред да почне со анализа на примероците. Со само три инјекции, статистички е невозможно да се докаже дека системот е во „рамнотежа“. Сите водечки фармакопеи бараат минимум 5 или 6 инјекции за овој параметар.

#### **Цитати од европска и американската фармакопеа**

##### **European Pharmacopoeia (Ph. Eur.) 2.2.46 (System Suitability):**

"The repeatability of injection is typically confirmed by a **minimum of 5 replicate injections** of the reference solution... unless otherwise justified."

##### **USP <621> (Chromatography), System Suitability:**

"Unless otherwise specified in the individual monograph, data from five replicate injections of the Standard solution are used to calculate the relative standard deviation if the requirement is 2.0% or less."

**9. Кандидатот тврди дека RSD од 1.13% е во рамките на критериумите при евалуација на повторливост:**

"The obtained results were used to calculate the RSD (1.13%), which fell within the acceptance criterion, indicating that the method is precise when performed under the same conditions, for a short period, on the same sample"

Во аналитиката на лекови, особено за одредувањето на содржината, границата за прифатливост на RSD кај реплицирани примероци е често многу построга од 1.0%. Вредност од 1.13% во контролирани лабораториски услови е јасен индикатор за нестабилност на методот. Оваа висока варијабилност е директна последица на претходно утврдениот проблем — елуирање во зоната на празниот (мртвиот) волумен, каде што шумот на основната линија и онечистувањата од матрицата (растворувачи + ексципиенси + онечистувања) ја попречуваат прецизната интеграција на пикот.

**Цитати од европска и американската фармакопеа**

**ICH Q2(R2), Section 3.3.1 (Repeatability):**

"Repeatability should be assessed using: a) a minimum of 9 determinations covering the specified range... or b) a minimum of 6 determinations at 100% of the test concentration."

**ISO 5725-2 (Accuracy/Trueness and Precision of measurement methods):**

"The precision of a measurement method is the closeness of agreement between independent test results obtained under stipulated conditions. [...] Large standard deviations indicate a lack of control over the measurement process."

**10. Недоследност на статистичките трендови (Accuracy vs. Repeatability)**

Постои сериозна статистичка неусогласеност помеѓу податоците пријавени во Табела 1 (Accuracy) и резултатите од повторливоста (Repeatability). Кандидатот покажува исклучително ниски вредности на RSD при високи концентрации (0.13% на 130% ниво), додека при стандардната работна концентрација од 100%, варијабилноста енорно се зголемува на 1.13%.

Овој тренд е спротивен на логиката на аналитичката валидација. Доколку методот е вистински прецизен, неговата варијабилност не смее да се зголеми за речиси 9 пати при премин од 130% на 100% концентрација. Оваа нестабилност е јасен доказ дека методот не е робусен и дека зависи од среќни околности, а не од научна повторливост.

**Цитати од европска и американската фармакопеа и ICH**

**ICH Q2(R2), Section 3.3.3:**

"The precision of an analytical procedure is usually expressed as the variance, standard deviation or coefficient of variation of a series of measurements. [...] Significant differences in precision at different levels of the range indicate a lack of method control."

**European Pharmacopoeia (Ph. Eur.) 2.2.46 (Robustness):**

"The reliability of an analytical procedure is demonstrated by its consistency across the intended range."

**USP <1210> (Statistical Concepts in Assay Development):**

"Statistical control is achieved when the variability of the process is stable and predictable. Discrepancies in precision results across different validation stages suggest underlying methodological flaws."

Со ваквите контрадикторни податоци, кандидатот докажува дека неговиот метод е несигурен. Невозможно е еден метод да биде прецизен (RSD 0.13%) на едно ниво, а целосно непрецизен на работното ниво (RSD 1.13%). Ова е силен индикатор за слабо развиена метода која потфрла на основните тестови на **USP** и **Ph. Eur.** за конзистентност.

**11. Енормно високи вредности на RSD при евалуирање на интермедиерната прецизност (неприфатлива прецизност)**

Кандидатот пријавува RSD од 1.72% за првиот аналитичар и комбиниран RSD од 1.41%:

"The RSD was calculated individually for each analyst... the combined RSD value (1.41%) were within the acceptance criteria."

Во аналитиката на лекови, комбиниран RSD од 1.41% е превисок. Европската фармакопеја и индустриските стандарди за HPLC методи обично наложуваат RSD да биде под 1.0% за да се смета дека методот е под контрола. Вредноста од 1.72% кај првиот аналитичар е показател кој укажува на тоа дека методот е особено екстремно осетлив на човечки фактор, што е директна последица на лошата робусност и pH контрола.

**Цитати од европска фармакопеа и ICH**

**European Pharmacopoeia (Ph. Eur.) 2.2.46:**

"The analytical procedure should be validated to demonstrate that it is suitable for its intended purpose. [...] High variability in intermediate precision indicates a lack of method ruggedness."

**ICH Q2(R2), Section 3.3.2 (Intermediate Precision):**

"The objective of intermediate precision is to verify that the analytical procedure will provide the same results when performed by different analysts, on different days, or with different equipment."

#### 12. Кандидатот повторно користи само три инјекции од стандардот за докажување на интермедиерната прецизност

"Three consecutive injections were carried out for the standard solutions, and two consecutive injections were carried out for each sample solution."

Како што беше наведено претходно, ова е директно кршење на Ph. Eur. 2.2.46 и USP <621>. За пресметка на содржина со ваква прецизност, неопходни се најмалку 5 или 6 повторени инјекции на стандардот за да се осигура стабилноста на системот. Користењето на само две инјекции за примероците ја прави пресметката статистички несигурна.

#### 13. Анализа на содржина (%): Системска грешка (Bias)

Гледајќи ги поединечните резултати на првиот аналитичар (примерок 3 и 5), содржината оди до 102.90% и 102.99%.

Резултати од речиси 103% за содржина на Мелоксикам во инјекции се невообичаено високи и се на самата граница на спецификациите (обично 95.0% - 105.0%). Ова е уште еден доказ дека матрицата (растворувачи + ексципиенси + онечистувања) се меша со пикот на Мелоксикам во празниот (мртвиот) волумен, со што вештачки се зголемува површината на пикот и крајниот резултат.

#### Цитат од американската фармакопеа

##### USP <1210> (Statistical Concepts in Assay Development):

"When results are consistently on the higher end of the specification, it may indicate a systematic bias or lack of specificity (matrix interference)."

Делот за меѓулабораториска прецизност е крунски доказ за невалидноста на методот. Со RSD вредности кои достигнуваат до 1.72% и содржина која се приближува до 103%, кандидатот покажал дека неговиот метод не е во рамките на пропишаната регулатива. Прекршувањето на Ph. Eur. 2.2.46 и USP <621> во однос на бројот на инјекции на стандардот го прави овој тест регулаторно ништовен.

#### 14. Кандидатот наведува дека примерокот и плацебото ги подготвувал со растворање во метанол, во делот кога евалуира специфичноста на методот

"The sample solution was prepared by dissolving the active substance in Methanol, whereas the placebo solution was prepared by dissolving the excipients in the same solvent."

Ова е критична грешка во методот. Мелоксикам инјекциите се водни раствори со специфична pH вредност и ексципиенси, стабилизирани во водна средина. Со користен на чист метанол како растворувач за плацебото, кандидатот ја менува растворливоста хемиското однесување на ексципиенсите. Ова значи дека неговиот доказ за отсуство на интерференција е неважечки, бидејќи тој не ја тестира реалната матрица на лекот, туку вештачка мешавина во метанол.

#### Цитати од ИСН и европска фармакопеа:

##### ICH Q2(R2), Section 3.1.1 (Specificity)

"For the identification test, the procedure should be able to discriminate between compounds and closely related structures which are likely to be present. [...] Specificity should be demonstrated by the analysis of samples with added impurities and/or excipients and showing that the assay result is unaffected by the presence of these materials."

##### European Pharmacopoeia (Ph. Eur.) 2.2.46:

"The analytical procedure must be shown to be unaffected by the presence of impurities and excipients. [...] The composition of the test solution should be representative of the product to be analyzed."

#### 15. Кандидатот евалуирање на специфичноста тврди дека нема интерференција:

"No interferences were observed within the elution zone of the active substance in the presence of the excipients."

Бидејќи Мелоксикамот елуира екстремно рано (во празниот/мртвиот волумен), тој елуира заедно со фронтот на растворувачот (solvent front). Повеќето ексципиенси кои не се задржуваат на колоната излегуваат токму во оваа точка. Со тврдењето дека нема интерференција, кандидатот веројатно го игнорира фактот дека UV-детекторот во таа точка веќе е заситен од сигналот на матрицата, што го прикрива вистинското преклопување. Без приложен хроматограм со висока резолуција на почетните 2 минути, ова тврдење е научно неосновано. Прекршување на USP <1225> за идентификација: според USP, специфичноста не е само „да нема пик“, туку да се докаже дека пикот на анализот е чист (Peak Purity).

#### Цитати од ИСН и европска фармакопеа од американска фармакопеа

##### USP <1225> (Validation of Compendial Procedures):

"In the case of an assay, demonstration of specificity requires that the procedure is unaffected by the presence of impurities, degradants, or placebo components. [...] If the procedure is not inherently specific, a combination of two or more analytical procedures should be used to achieve the necessary level of discrimination."

Тестот за специфичност е методолошки промашен. Со користење на метанол за подготовка на плацебото, кандидатот го анализирал погрешниот хемиски систем, игнорирајќи ја реалната матрица (растворувачи + ексципиенси + нечистотији) на инјекцијата. Тврдењето дека нема интерференција во зоната на елуција е невозможно да се потврди, бидејќи таа зона се преклопува со празниот (мртвиот) волумен, каде што селективноста на методот е еднаква на нула. Ова е во директна спротивност со ICH Q2(R2) и Ph. Eur. 2.2.46 стандардите за недвосмислена идентификација на аналитот."

#### 16. Ако ја погледнеме равенката на правата од графикот: $y=21255529x-548914$ .

Вредноста на  $y$ -интерсепт е  $-548,914$ . Ова е енормно голема негативна вредност. Во идеален и точен метод, кога концентрацијата е  $0$  ( $x=0$ ), површината на пикот ( $y$ ) треба да биде  $0$  или многу блиску до неа.

Овој огромен негативен интерсепт значи дека линеарната права не поминува низ почетокот на координатниот систем. Ова е математички доказ дека постои системска грешка (Systematic Bias), Како што концентрацијата се намалува, методот станува сè понеточен, што е директна последица на лошата интеграција на пикот во зоната на мртвиот волумен.

#### Цитати од ICH, американска и европска фармакопеа

##### ICH Q2(R2), Section 3.2.3 (Linearity):

"The  $y$ -intercept, slope, and correlation coefficient should be reported. A significant deviation of the  $y$ -intercept from zero may indicate a constant systematic error."

##### USP <1210> (Statistical Concepts in Assay Development):

"The intercept should be evaluated for its clinical and analytical significance. A large intercept relative to the response at the target concentration suggests a lack of specificity or a constant bias."

##### European Pharmacopoeia (Ph. Eur.) 2.2.46:

"Linearity is typically demonstrated by a correlation coefficient... however, the  $y$ -intercept must be close to zero to ensure accuracy at lower concentrations within the range."

#### 17. Несоодветен и вештачки поместен опсег (Range)

Кандидатот наведува дека работната концентрација е  $0.2 \text{ mg/mL}$ . Ако ги погледнеме точките на графикот ( $x$ -оска), најниската точка е околу  $0.16 \text{ mg/mL}$  (што е  $80\%$  од работната концентрација), додека па највисоката точка е околу  $0.26 \text{ mg/mL}$  (што е  $130\%$  од работната концентрација).

Во претходниот дел за **точност (Accuracy)** кандидатот тврдеше дека испитувал нивоа од **130%, 150% и 180%**. Меѓутоа, неговиот график за линеарност завршува на **130%** (0.26 mg/mL).

Според **ICH** и **USP**, опсегот (**Range**) мора да биде поддржан со линеарност. Кандидатот не може да тврди дека методот е точен на 180% (од делот за **точност (Accuracy)**) ако неговата линеарност прекинува на 130%. Ова е класичен пример за неповрзани и потенцијално „наштелувани“ податоци.

#### 18. Лажна сигурност со $R^2=0.999$

Кандидатот се потпира на високиот коефициент на корелација:

" $R^2$  was determined to be within the acceptance criterion, indicating a linear relationship..."

Во аналитиката на лекови  $R^2$  сам по себе не е доказ за линеарност. Висок  $R^2$  може да се добие дури и ако податоците се закривени (курвilinearни), доколку опсегот е мал. Кандидатот не приложил график на резидуи (Residual Plot), кој би открил дали точките навистина лежат на права линија или имаат тренд на отстапување поради матрицата (растворувачи + ексципиенси + нечистоти).

Графикот на линеарност (Слика 1) е математички доказ за невалидноста на методот. Енормниот негативен у-интерсепт (-548,914) потврдува присуство на постојана системска грешка (Systematic Bias), што го прави квантитативното одредување несигурно. Дополнително, постои сериозна контрадикција помеѓу овој дел и делот за точност: кандидатот не докажал линеарност за високите концентрации (150% и 180%) кои претходно ги пријавил како точни. Ова е директно кршење на **ICH Q2(R2)** и **USP <1225>** стандардите за валидација на опсег и линеарност.

#### 19. Промена во ефикасноста на колоната (N), за робусноста на методот

Ако се погледнат вредностите за бројот на теоретски подови (N), прикажани во табела 3 кој ја претставува ефикасноста на колоната:

- При промена на соодносот на мобилната фаза од 55:45 на 65:35, се гледа дека ефикасноста паѓа од ~6900 на ~5500.
- При промена на протокот (flow rate) од 1.3 mL/min на 1.7 mL/min, се гледа дека ефикасноста паѓа од ~7000 на ~5400.

Губење на ефикасноста од над 20% при мали промени на параметрите е доказ дека методот не е робусен. Во аналитиката на лекови, робусен метод е оној каде што ваквите промени немаат значително влијание врз перформансите. Овој пад на N директно влијае на способноста на методот да го раздвои Мелоксикамот од неговата матрица (растворувачи + ексципиенси + нечистоти).

Цитати од ИСН и европска фармакопеа :

**ICH Q2(R2), Section 3.5 (Robustness):**

"The robustness of an analytical procedure is a measure of its capacity to remain unaffected by small, but deliberate variations in method parameters... If measurements are susceptible to variations in analytical conditions, the analytical conditions should be suitably controlled."

**European Pharmacopoeia (Ph. Eur.) 2.2.46:**

"Small variations in the composition of the mobile phase, pH, or flow rate should not significantly affect the performance of the chromatographic system."

## 20. Промена на асиметријата ( $A_s$ ) при промена на pH

При промена на pH вредноста за само 0.4 единици (од 2.9 на 3.3): асиметријата ( $A_s$ ) се променува од **1.18** на **1.56**.

Асиметрија од **1.56** е на самата граница на регулаторна прифатливост (границата е 1.5). Фактот што промена на pH од само 0.4 единици го деформира пикот толку драстично, докажува дека стабилноста на Мелоксикамот во овој метод е критично лоша. Бидејќи пикот елуира во празниот (мртвиот) волумен, секоја промена на pH предизвикува хаос во неговата форма, што води до неточна интеграција и погрешни резултати за содржината.

## 21. Критична зависност на капацитет-факторот ( $k'$ )

При промена на соодносот на мобилната фаза (од 55:45 на 65:35),  $k'$  се менува од **2.5** на **3.2**. Робусноста треба да докаже дека методот е стабилен. Ваква варијација на ( $k'$ ) влијае на ретенционото време на анализот што значи дека во лабораторија, ако апаратот направи минимална грешка во мешањето на растворувачите, резултатот ќе биде целосно погрешен. Кандидатот го занемарил фактот дека **USP** и **Ph. Eur.** бараат методот да не биде осетлив на овие промени.

Цитат од американската фармакопеа

**USP <1225> (Validation of Compendial Procedures):**

"The robustness of an analytical procedure is a measure of its capacity to remain unaffected by small, but deliberate variations in method parameters and provides an indication of its reliability during normal usage."

Резултатите од Табела 3 се финалниот доказ дека методот е невалиден. Иако кандидатот заклучува дека методот е робусен, неговите сопствени бројки покажуваат губење на ефикасноста на колоната за преку 20% и драстично влошување на асиметријата на пикот

при минимални промени на pH. Ваквата нестабилност го прави методот неупотреблив за рутинска контрола на лекови според Ph. Eur. 2.2.46 и USP <621>, каде што робусноста е основен столб за безбедност и квалитет.

Трудот за Мерна несигурност (Measurement Uncertainty - MU) "Estimation of Measurement Uncertainty Using Top-Down and Bottom-Up Approaches for Accurate Content Determination of Meloxicam in Injectable Dosage Forms" е клучен бидејќи ги поставува темелите на сите наредни математички грешки. Кандидатот го цитирал својот претходен труд за валидација "DEVELOPMENT AND VALIDATION OF HPLC METHOD FOR CONTENT DETERMINATION OF MELOXICAM IN INJECTIONS", во повеќе наврати низ трудот за мерна несигурност.

Референцата (8) што ќе се користи за понатамошно објаснување е трудот на кандидатот "DEVELOPMENT AND VALIDATION OF HPLC METHOD FOR CONTENT DETERMINATION OF MELOXICAM IN INJECTIONS", (истиот труд за кој пишував до сега) и е означен под број (8) во користените референци на "Estimation of Measurement Uncertainty Using Top-Down and Bottom-Up Approaches for Accurate Content Determination of Meloxicam in Injectable Dosage Forms"

### 1. Несигурност при интеграција (ApexTrack)

Кандидатот се потпира на автоматски алгоритам за интеграција цитирајќи го претходниот труд: "...ApexTrack integration algorithm (8). ApexTrack е екстремно осетлив на шум кај основната линија. Бидејќи во референца (8) е утврдено дека елуацијата е во мртвиот волумен (каде шумот е најголем), несигурноста при дефинирање на почетокот и крајот на пикот е енормна. Според ISO/IEC 17025 и Eurachem Guide CG 4, пресметката на мерна несигурност мора да се заснова на валидиран и специфичен метод. Бидејќи во трудот (8) е документирано дека Мелоксикамот елуира во празниот (мртвиот) волумен ( $k' < 2$ ), тој метод е неспецифичен.

### 2. Промена во масата на референтниот стандард и волуменот на користената тиквица

Во трудот за валидација користел маса од 10mg за референтниот стандард и волуменска тиквица од 50ml, додека во трудот за мерна несигурност иако го цитира претходниот труд сепак направил промена и користел маса од 20mg за референтниот стандард и волуменска тиквица од 100ml

Секој волуметриски сад (100 ml vs 50 ml) има различна специфицирана несигурност (толеранција). Дополнително, кандидатот користи различни мерни операции: мерење за стандардот (20 mg) и пипетирање за примерокот (1.0 ml). Според Според Eurachem/CITAC Guide CG 4 несигурноста на пипетирање е значително поголема од несигурноста на вагање. Доколку кандидатот во финалната пресметка не ги раздвоил овие две различни компоненти на несигурност, неговата вредност за U (проширена несигурност) е математички измислена. Несигурноста на вагање на 10 mg е процентуално двојно поголема од несигурноста на вагање на 20 mg на истата вага

Оваа разлика е доказ за неконзистентноста на неговата работа. Иако финалната концентрација математички останува иста (0.2 mg/ml), од метролошка гледна точка, оваа промена помеѓу двата труда го руши кредибилитетот на пресметката за мерна несигурност. Бидејќи кандидатот ја цитира референцата (8) за методологијата, тој мора да ги користи истите извори на несигурност.

Сосема е недозволено да бидат прифатени направените промени ако веќе кандидатот се повикува (ставил референца) на податоците од претходниот негов труд. Направил промена и во начинот на изработка на референтниот раствор, а и во користениот референтен раствор. Во претходниот труд за валидација ја нема наведено чистотата на референтниот стандард (99.0%) додека во овој труд ја внесува и чистотата (99.00% ± 0.08%), а сепак се повикува на цитат. Чистотата сега е декларирана намерно, зошто без декларирана чистота кандидатот не може да ги направи пресметките за Bottom up пристапот, што е чиста научна контрадикција

Во трудот за валидација користи 50.0 mL волуменска тиквица со сонификација на само половина волумен од метанол, што воведува неконтролирана термичка експанзија и грешка во концентрацијата. Во трудот за несигурност, кандидатот го менува садот на 100.0 mL, што претставува недозволена девијација, ако методот претходно веќе е валидиран. Но поради тоа што неговиот метод не е валидиран и валидацијата како што видовме претходно е комплетно пропадната, промените ги направил само за да ги нашминка крајните резултати што ќе ги добие за мерната несигурност.

#### Цитат од ISO/IEC и Eurachem/CITAC Guide

**ICH Guideline Q2 (R1) / Q2 (R2), Section 1.2:** "Re-validation may be necessary in the following circumstances: changes in the synthesis of the drug substance; changes in the composition of the finished product; changes in the analytical procedure."

**Eurachem/CITAC Guide CG 4, Section 6.1:** "The laboratory must identify all sources of uncertainty... Common sources include: sampling, storage conditions, instrument effects, reagent purity, volumetric equipment, and weighing."

**ISO/IEC 17025:2017, Section 7.6.1:** "Laboratories shall identify the contributions to measurement uncertainty. When evaluating measurement uncertainty, all contributions that are of significance, including those coming from reference materials, shall be taken into account using appropriate methods of analysis."

**ISO/IEC 17025:2017, Section 7.6.3:** "The laboratory shall identify the contributions to measurement uncertainty. When evaluating measurement uncertainty, all contributions that are of significance in the given situation shall be taken into account using appropriate methods of analysis."

**Eurachem/CITAC Guide, Section 6.4.2:** "The uncertainty of volume is specific to the flask used. If a 100 mL flask is substituted for a 50 mL flask, the uncertainty component must be recalculated."

**3. Во Слика 1 (Fishbone дијаграмот), кандидатот истовремено ги прикажува Top-down и Bottom-up компонентите како да се дел од еден ист математички модел.**

Според ISO 21748, компонентите на прецизност и точност (Top-down) веќе во себе ги содржат варијациите од мерењето на масата и волуменот (Bottom-up). Со вклучување на двата пристапи во една финална пресметка (како што е наведено во текстот: "...expanded the model to include additional contributors..."), кандидатот врши двојно броење (Double Counting) на истите извори на грешка. Ова вештачки ја менува мерната несигурност и ја прави статистички невалидна.

**Цитати од Eurachem/CITAC Guide и ISO**

**Eurachem/CITAC Guide (Quantifying Uncertainty), Section 3.2:**

"It is important to avoid double counting of uncertainty sources. If the uncertainty is estimated from method validation data (Top-down), the individual contributions (Bottom-up) are already inherent in the precision and bias."

**ISO 21748:2017, Guidance on the use of repeatability, reproducibility, and trueness estimates:**

"Duplication of uncertainty components shall be avoided when combining estimates from different approaches."

**4. Кандидатот ја дефинира мерната вредност (measurand) како концентрација на Мелоксикам во mg/mL.**

Како што утврдивме претходно во претходниот дел од напишаното, методот елуира во празниот (мртвиот) волумен ( $k' < 2$ ). Во зоната на мртвиот волумен, специфичноста на методот е компромитирана. Според EDQM, за да се дефинира „Measurand“, мора прво да се гарантира селективноста. Бидејќи кандидатот не вклучил гранка во „Fishbone“ дијаграмот за селективна несигурност, неговиот модел е научно нецелосен.

**Цитати од EDQM Quality Management Document**

**EDQM Quality Management Document (PA/PH/OMCL (05) 49):**

"The identification of uncertainty sources must be exhaustive... including potential interferences from the matrix which can affect the measurand definition."

Слика 1 и придружната дискусија се статистички парадокс. Кандидатот се обидува да ги собере Top-down и Bottom-up пристапите, што е директно прекршување на Eurachem водичите поради двојно броење на истите извори на несигурност. Понатаму, дијаграмот за идентификација на изворите е нецелосен бидејќи свесно ги изоставува доминантните грешки: Bias од линеарноста и несигурноста од недостаток на селективност во мртвиот волумен. Овој дел од трудот е само визуелна конструкција која не ги одразува реалните метролошки ризици на аналитичкиот метод.

**5. Во делот на Top-Down пристапот кандидатот тврди дека пресметал  $u(p)=1.035\%$  користејќи податоци од двајца аналитичари.**

Оваа пресметка е метролошки невалидна. Според ISO 21748, за да постои инетермедиерна прецизност, варијацијата мора да вклучува време (различни денови). Кандидатот го извршил тестот во ист ден. Вредноста од 1.39% ( $RSD_{BR}$ ) не е „меѓу-сериска“ варијација, туку обичен „шум“ помеѓу двајца колеги во иста смена. Со игнорирање на варијациите од нов пуфер, промена на pH и инструментални промени, кандидатот пресметал само повторливост, а ја означил како инетермедиерна прецизност. Реалната несигурност сигурно ќе била поголема ако имало направено повторувања во повеќе денови

#### Цитати од EDQM и ISO

**ISO 21748:2017, Section 6.2:** "Intermediate precision conditions shall include variation of factors such as time (different days) and calibration batches."

**EDQM Annex 2.1:** "Uncertainty from precision must be representative of long-term laboratory performance, typically requiring data collected over several days."

**6. Кандидатот пресметал  $t_{exp}(8.69) > t_{crit}(2.31)$ , докажувајќи дека методот има значајна системна грешка Bias (1.26%).**

Ова е најголемиот недостаток. Кандидатот го применил Пристап II (девијација од средната вредност 101.26%) наместо Пристап I (девијација од 100%). Со ова кандидатот му „простува“ на методот што греша за 1.26%. Тој ја мери само варијацијата околу својата грешка, наместо самата грешка. Вредноста  $u_b=0.0041$  е фиктивна. Таа претставува проценка на прецизноста маскирана како несигурност.

#### Цитати од Eurachem QUAM и ISO/IEC

**Eurachem QUAM, Section 7.7.1:** "Where a significant bias is identified... the uncertainty must account for the deviation from the true/target value (100%)."

**ISO/IEC 17025:2017, Section 7.6.1:** "The laboratory shall evaluate measurement uncertainty using data that reflects the actual conditions and performance against the reference value."

### 7. Кандидатот пресметува комбинирана несигурност $U_c$

Добиената вредност за  $u(p)$  не точна и е потценета (поради еднодневното тестирање), а  $u(b)$  е лажирана (поради користење на средната вредност), финалната вредност  $U$  проширената несигурност (expanded uncertainty) е неточна.

Цитати од ICH Q2 (R2) & USP и GUM (JCGM 100:2008):

**ICH Q2 (R2) & USP <1225>**: "The analytical procedure must be shown to be fit for its intended purpose... Accuracy must be evaluated at the 100% level for dosage forms."

**GUM (JCGM 100:2008)**: "The components of uncertainty must be representative... failure to include significant bias results in a non-compliant uncertainty statement."

Квантификацијата преку Top-Down пристапот е метролошки неважечка. Кандидатот ги прекршил ISO 21748 (со изведување на тестот во еден ден) и Eurachem QUAM (со маскирање на значајниот Bias преку девијација од средната вредност). Овие дејствија претставуваат статистичка манипулација со цел да се прикрие неспособноста на методот да даде точен и репродуктивен резултат во согласност со фармакопејските стандарди. Како резултат на ова, целата пресметка за мерна несигурност треба да се отфрли како нерепрезентативна.

### 8. Кандидатот идентификува промена на волуменот од 0.596 mL за варијација од само $\pm 4$ °C. Ова претставува грешка од 0.6% само од температура.

Во прецизна HPLC анализа, ова е енормален извор на „шум“. Додека кандидатот го пресметува ова во „Bottom-Up“ моделот, неговата „Top-Down“ прецизност ( $u(p)$ ) веќе ги содржи ефектите од лабораториската температура за време на деновите на валидација. Со нивното собирање во Равенка 6, кандидатот врши директно кршење на принципите за независност на изворите на несигурност.

Цитати од Eurachem и ISO

**Eurachem/CITAC Guide CG 4, Section 3.2**: > "It is important to avoid double counting... If a source of uncertainty is already captured in another component (like precision), it should not be added again."

**ISO 21748:2017**: > "Duplication of uncertainty components shall be avoided when combining estimates from different approaches."

### 9. Подготовката на примерокот открива огромна несигурност кај пипетата од 1.77%.

За фармацевтска дозирана форма инјекција, несигурност од 1.77% од само еден чекор на пипетирање е професионално неприфатлива.

Овој поединечен чекор е 4 пати поголем од целата подготовка на стандардот. Секоја акредитирана лабораторија според ISO 17025 би барала поголем волумен на примерок за да се намали овој „шум“. Користењето на овој резултат како основа за пресметка само ја потврдува нефункционалноста на постапката на кандидатот.

#### Цитати од ISO и USP

**ISO 8655-2:2022:** > "The error of measurement can be significantly influenced by the liquid's properties... For critical assays, the choice of volumetric apparatus must minimize the relative error."

**USP <1225>:** > "The precision of an analytical procedure is the degree of agreement among individual test results... high variability in sample preparation renders the method unsuitable for its intended use."

#### 10. Кандидатот ги собира Bottom-Up резултатите со Top-Down резултатите во Равенка 6.

Бидејќи прецизноста ( $u_p$ ) е одредена додека аналитичарите физички ги користеле истите пипети и тиквички, грешката од пипетата од 1.77% е веќе содржана во несигурноста од прецизност. Со нивно собирање, кандидатот создава некоја нова несигурност која не постои во реалноста.

#### Пресметки на грешката на кандидатот:

**Bottom-Up uc (со грешка):**  $\approx 2.16\%$

**Expanded Uncertainty (U,k=2):** 4.32%

Во докторски труд во областа на аналитика на лекови, каде спецификациите се  $\pm 5\%$ , мерна несигурност од  $\pm 4.32\%$  е неупотреблива.

#### 11. Кандидатот посветува огромен простор на несигурноста на моларната маса ( $u=0.0000208$ ).

Оваа вредност е 180 пати помала од несигурноста на тиквичките. Вклучувањето на вакви занемарливи компоненти, додека се игнорираат катастрофалните грешки во пипетирањето и неадекватните податоци добиени од валидацијата на методата се класична тактика за создавање илузии за ригорозност во научниот пристап

#### Цитати од Eurachem QUAM:

**Eurachem QUAM, Section 3.4.1:** > "Components that are less than one-fifth of the largest component do not need to be evaluated in detail."

**GUM (JCGM 100:2008):** > "Only significant components of uncertainty should be included in the final uncertainty budget to avoid obfuscation of the results."

Финалната пресметка во овој труд е математички парадокс. Огромната дискрепанца помеѓу Top-Down (2.22%) и Bottom-Up (4.32%) моделите докажува дека Равенка 6 е погрешно поставена и врши двојно броење на компонентите. Методот е толку непрецизен што проширената несигурност од 4.32% го прави невозможно докажувањето на квалитетот на лекот во границите на фармакопејата. Овој труд не е научен придонес, туку збирка на статистички грешки маскирани во комплексни формули.

**12.Кандидатот наведува дека поради значајниот Bias, ја коригирал средната вредност од 15.156 mg на 14.967 mg.**

Ова е најочигледниот доказ дека самиот аналитички метод е невалиден. Во аналитиката на лекови, доколку метод за рутинска контрола на квалитет бара постојана математичка корекција на Bias-от за да дојде до точен резултат, тој метод не е соодветен за намената.

Корекцијата е направена врз основа на recovery податоци од само еден ден. Доколку следниот ден Bias-от се промени (поради pH на пуферот или температурата), математичката корекција ќе биде погрешна, што ќе доведе до лажни резултати за квалитетот на лекот.

#### Цитати од ICH и Eurachem QUAM

**ICH Q2 (R2), Section 3.2.2:** > "If a significant bias is found, the cause should be investigated and the method should be improved. Relying on mathematical corrections for routine testing is not acceptable for pharmaceutical release."

**Eurachem QUAM, Section 7.7.1:** > "The preferred approach is to eliminate the bias by modifying the method. If this is not possible, the uncertainty must reflect the instability of the bias over time."

**13.Кандидатот пријавува комбинирана несигурност од 2.156% за Bottom-up пристапот, што е речиси двојно повеќе од Top-down пристапот (1.11%).**

Оваа огромна разлика помеѓу двата модели докажува дека равенка 6 е статистички дефектна. Како што докажавме, кандидатот ги брои пипетата и тиквичките двапати. Во секоја валидна метролошка студија, двата пристапи (Top-down и Bottom-up) треба да конвергираат кон слична вредност. Разликата од 100% помеѓу моделите на кандидатот е јасен сигнал за статистички хаос во неговиот труд.

**14. Во Bottom-up пристапот, кандидатот добива интервал од 14.321–15.613 mg.**

Доколку земеме дека толеранцијата за инјекции обично е  $\pm 5\%$  (95–105%), т.е. **14.25–15.75 mg**. Проширената несигурност на кандидатот од  **$\pm 4.31\%$**  (0.646 mg) го зафаќа речиси целиот дозволен простор на спецификацијата. Овој метод е **неупотреблив** за контрола на квалитет. Со ваква несигурност, не можете да разликувате лек кој е на граница на спецификацијата од лек кој е неисправен.

#### Цитати од ISO и американска фармакопеа

**ISO 14253-1 (Decision Rules):** > "The expanded uncertainty must be significantly smaller than the specification zone to allow for a clear compliance decision."

**USP <1210>:** > "A measurement system is considered inadequate if the expanded uncertainty consumes a large portion of the specification interval, leaving no room for manufacturing variability."

#### 15. Кандидатот користи $k=2$ за 95% доверба.

Бидејќи податоците се генерирани во само еден ден, овој интервал на доверба е фиктивен. Тој не претставува 95% доверба за лабораторијата во текот на годината, туку само за тие неколку часа кога кандидатот ги правел мерењата. Ова е класично кршење на ISO 17025 барањата за репрезентативност на податоците.

#### Цитати од ISO и GUM (JCGM 100:2008)

**ISO/IEC 17025:2017, Section 7.6.1:** > "Uncertainty evaluations shall be representative of the actual performance of the method under the conditions of use."

**GUM (JCGM 100:2008):** > "The combined standard uncertainty should be based on all significant components... including long-term stability and reproducibility over time."

Финалните резултати од овој труд ја потврдуваат неговата научна безвредност. Пресметаната проширена несигурност од 4.31% е професионално неприфатлива за фармацевтска анализа во областа на аналитиката на лекови, бидејќи го оневозможува носењето на одлуки за квалитетот на лекот. Кандидатот призна дека методот е неточен преку воведување на математички корекции за Bias, а неговиот хибриден модел (Равенка 6) е математички дефектен поради двојно броење на грешките. Овој труд не ги задоволува ниту минималните критериуми на ISO 17025, Eurachem или USP за проценка на мерна несигурност.

Последниот труд кој е објавен од кандидатот и е наведен од рецензентската комисија е трудот со наслов "Software-assisted analytical Quality by Design for stability-indicating method development: integration of DoE and predictive retention modeling using MODDE® and DryLab®". И овој труд е јавно достапен во репозиториумот на Универзитетот „Гоце Делчев“ – Штип. Трудот е објавен во Macedonian pharmaceutical bulletin, 72 (2) 3 - 15

(2026) ISSN: 1857-8969, DOI: 10.33320/maced.pharm.bull.2026.72.02.001, Review paper. Ova e прегледен труд, како што е и наведено.

Кандидатот го користи овој прегледен труд за теоретски да ги објасни софтверите (MODDE и DryLab), иако во неговите претходни експериментални трудови нема доказ дека тој навистина знае да ги користи тие алатки за да добие валидни резултати. Трудот е научна статија која не презентира нови експериментални резултати (оригинални податоци).

Во овој труд, кандидатот детално ги објаснува предностите на DryLab® за предикција на ретенцијата и робусноста. DryLab е софтвер кој примарно служи за да се избегне елуирање на супстанциите во празниот (мртво) волумен. Ако кандидатот навистина го разбира и користи DryLab (како што имплицира во прегледниот труд), како е можно во неговиот експериментален труд Мелоксикамот да му елуира во мртво време ( $k' < 2$ )? Софтверот веднаш би го означил неговиот метод за Мелоксикам како невалиден поради нискиот фактор на капацитет ( $k' < 2$ ).

Овој труд е само теоретско цитирање на други автори како работеле. Резултатите на кандидатот докажуваат дека тој не го користел софтверот. Самиот кандидат во своите објавени трудови признава постоење на статистички значајна системска грешка.

Во трудот се дискутира за MODDE® и неговата улога во дефинирање на Design Space. MODDE служи за пресметување на интеракциите помеѓу факторите (pH и температура). Но, во неговиот труд за мерна несигурност, кандидатот пријавува огромна системска грешка (systemic bias) од 1.26% и несигурност од 4.32%. MODDE и AQBД принципите служат токму за да се минимизира несигурноста и да се елиминира системската грешка. Фактот што неговите резултати се надвор од сите дозволени граници докажува дека кандидатот ја користи само статистичката терминологија на MODDE само како „укус“ во ревијалниот труд, без воопшто да ја примени во реалноста.

Кандидатот пишува дека овој пристап овозможува „поддршка на регулаторната флексибилност“. Регулаторната флексибилност (според ICH Q14) се добива само ако има докажана и робусна работна област (MODR). Методот на кандидатот, кој варира во масите (10mg vs 20mg) и садовите (50ml vs 100ml) помеѓу два објавени труда, е антитеза на робусноста. Не можете да барате „регулаторна флексибилност“ за метод кој не е во состојба да ја задржи истата процедура.

На крајот само ќе додадам согласно сите изнесени неусогласености и пропадната валидација на изократска метода за баланс на маса е невозможно да се добие точен резултат. Во аналитиката на лекови билансот на маса е компаративна равенка. Ако од едната страна на равенката има неуспешен метод тогаш целиот резултат е научно неважечки, бидејќи изократскиот метод не ги исполни основните параметри за валидација. Зошто кандидатот валидирал градиентна метода ако тврдел дека изократската е поедноставна за работа и за пократко време.

Споменатата оптимизација во рецензијата требало да се направи пред валидацијата на методот. Дали е направена оптимизација на методот? Сите укажани недоследности не упатуваат кон тоа. Трансфер на методот е непоточка можност согласно сите изнесени недоследности.

Барам од рецентската комисија да направи увид и ревизија во комплетната работа на кандидатот и ревизија на изворните сурови податоци

Очекувам писмен и научно аргументиран одговор на вкупно сите укажани недоследности од рецентската комисија. Исто така очекувам Правилникот за трет циклус на студии на Универзитет Гоце Делчев –Штип да биде испочитуван и приговорот заедно со одговорот да бидат објавени со билтенот на Универзитет Гоце Делчев –Штип.

Со Почит

Софија Петковска



Доктор на аналитика на лекови