

Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования  
НИЖЕГОРОДСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ  
Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации

КАФЕДРА ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ ХИМИИ И ФАРМАКОГНОЗИИ

# Валидация фармакопейных методов

Доцент кафедры фармацевтической химии и фармакогнозии, к.х.н

**Жильцова Ольга Евгеньевна**

# Валидация фармакопейных методов

**Качество** (Международный стандарт ИСО 8402) — совокупность свойств и характеристик ЛС, которые влияют на его способность оказывать профилактическое и/или лечебное действие.

**Валидация (GMP)** — получение документированного подтверждения того, что **конкретный производственный процесс** обеспечит с высокой степенью надежности получение продукта, отвечающего *заранее установленным спецификациям* и показателям качества.

На **первом этапе** термин «валидация» относится к  
*Квалификации оборудования*

**DQ** — *Дизайн-квалификация*, - до установки оборудования. Она определяет операционные и функциональные спецификации/требования к оборудованию и детали обоснованного решения в выборе поставщика.

**IQ** — *Инсталляционная квалификация*, - к установке оборудования и определяет его соответствие назначению и требованию.

**OQ** — *Операционная квалификация*, процесс, демонстрирующий эффективность функционирования оборудования согласно требованиям

**PQ** — *Эксплуатационная квалификация*, процесс, показывающий, способность оборудования к длительной и постоянной эксплуатации в условиях его рутинного использования.

# Валидация фармакопейных методов

Второй этап - Валидация (аттестация) метода анализа

**Валидация метода (Method validation)** – это подтверждение обоснованности выбора метода для определения показателей и норм качества ЛС по каждому разделу НД.

**Цель:** оценить соответствие специфических показателей качества ЛС в данной лаборатории при их сопоставлении с другими методами и в других лабораториях.

## Документы:

- общая фармакопейная статья в USP [The United States Pharmacopeia /The Nacional Formular XXVII./19. — 2004. — P. 2622—2625],
- ОФС РФ «Валидация фармакопейных методов»,
- ГОСТ РФ «Точность (правильность и прецизионность методов и результатов измерений)» [Государственный стандарт Российской Федерации. Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. ГОСТ Р ИСО 5725-1-2002],
- ГОСТ Р ИСО 5725-1-2002 (является полным аутентичным текстом международного стандарта ИСО 5725-1-1994),
- документы IUPAC (Международный союз фундаментальной и прикладной химии),
- ICN — международной конференции по гармонизации технических требований к регистрации лекарств для человека в странах ЕС, Японии и США [Validation of Analytical Procedures: Methodology. Recommended for Adoption at. Step 4 of the ICN Process on 6 November 1996 by the ICN Steering Committee ].

# **Валидация фармакопейных методов**

## *Перечень аналитических методов*

- количественные методы определения содержания активных и вспомогательных веществ, а также полуколичественные методы определения примесей или продуктов разложения;
- качественные методы определения содержания примесей или продуктов разложения;
- методы определения подлинности, предназначенные для подтверждения наличия анализируемого вещества путем сравнения свойств образца с существующим стандартом.

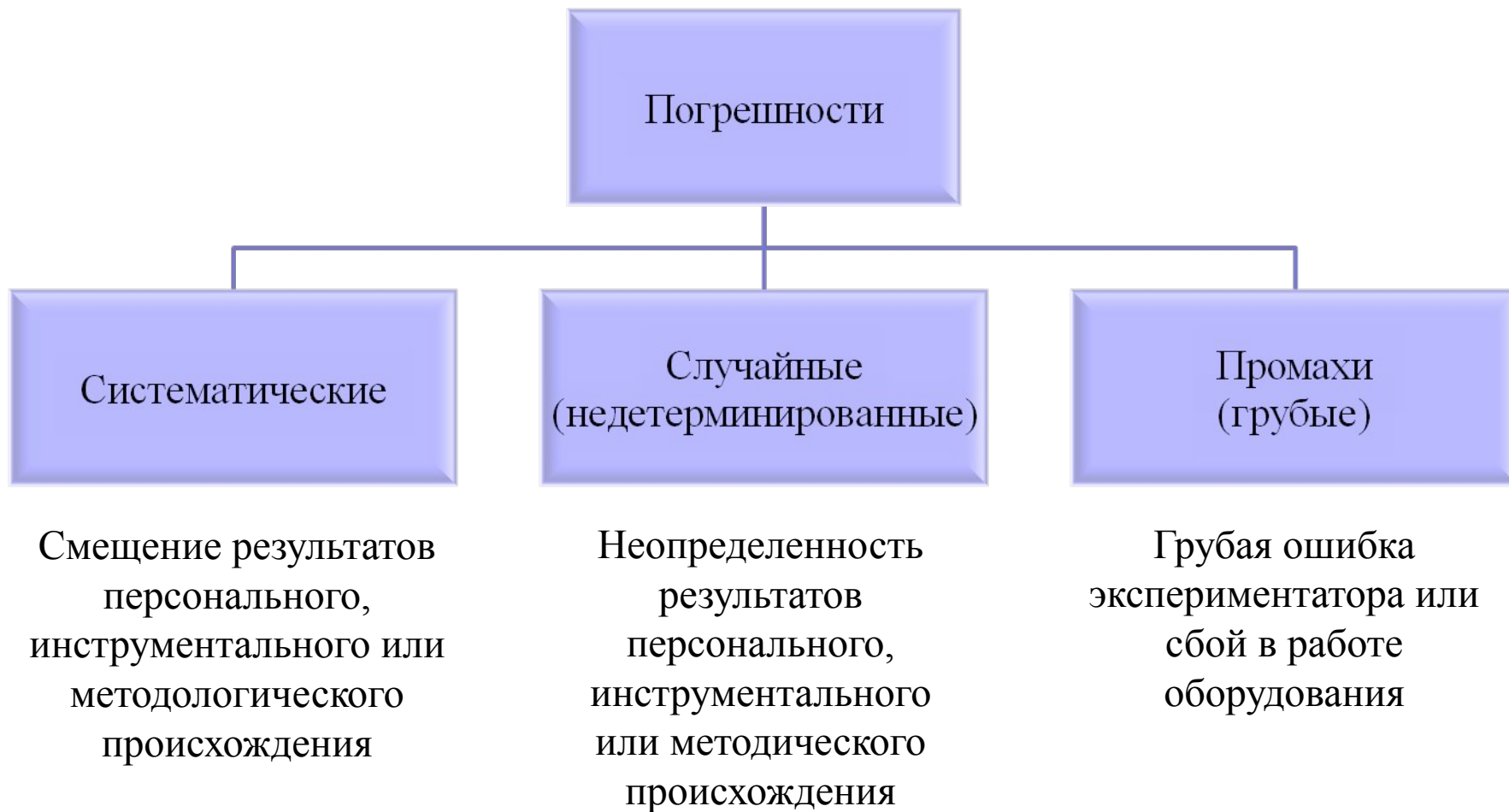
# Валидация фармакопейных методов

## Параметры валидации аналитической методики:

- Правильность (Accuracy)
- Прецизионность (Precision)
  - Сходимость (Repeatability)
  - Внутрилабораторная прецизионность (Intermediate Precision)
- Специфичность (Specificity)
- Линейность (Linearity)
- Робастность (Robustness)
- Диапазон применения (Range)
- Предел обнаружения (Detection Limit)
- Предел количественного определения (Quantitation Limit)

**Все параметры валидации оцениваются с использованием: погрешности и предельных значений анализируемых величин**

# Погрешности физико-химического анализа



Е от «error»

# Статистические методы



Нормальное распределение Гаусса  
(Интегральная функция распределения случайной величины)

Статистические параметры

характеристика  
положения

характеристика  
рассеяния (разброса)

# Статистические параметры

1. «Среднее арифметическое» усреднение из результатов, полученных при всех измерениях  $\bar{x}$

$$\bar{x} = \frac{x_1 + x_2 + x_3 + \dots + x_n}{n} \quad (1)$$

$n$  – количество опытов (или количество измерений случайной величины, подчиняющейся нормальному закону распределения Гаусса:  $x_1, x_2, x_3, \dots, x_n$ )

$f$  – число степеней свободы (число независимых вариантов):

$$f = n - 1$$

2. «Размах» - разность между самым большим и самым маленьким значениями:

$$R = x_{\max} - x_{\min}$$



# Статистические параметры

3. «Стандартное отклонение результата измерений» (выборочное стандартное отклонение) – характеристика воспроизводимости:

$$S_x = \sqrt{\frac{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}{f}} = \sqrt{\frac{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (2)$$

4. «Дисперсия» – это рассеяние результатов относительно среднего значения:

$$S_x^2 = \frac{(x_1 - \bar{x})^2 + (x_2 - \bar{x})^2 + (x_3 - \bar{x})^2 + \dots + (x_n - \bar{x})^2}{n-1(f)} \quad (3)$$

## Статистические параметры

5. «Коэффициент вариации» или «Относительное стандартное отклонение» (*Relative Standard Deviation, RSD*) – относительное стандартное отклонение ( $S_r$ ) - Мера разброса, характеризует прецизионность

$$VK(X) = \%RSD = \frac{S_x}{x} 100\% \quad (4)$$

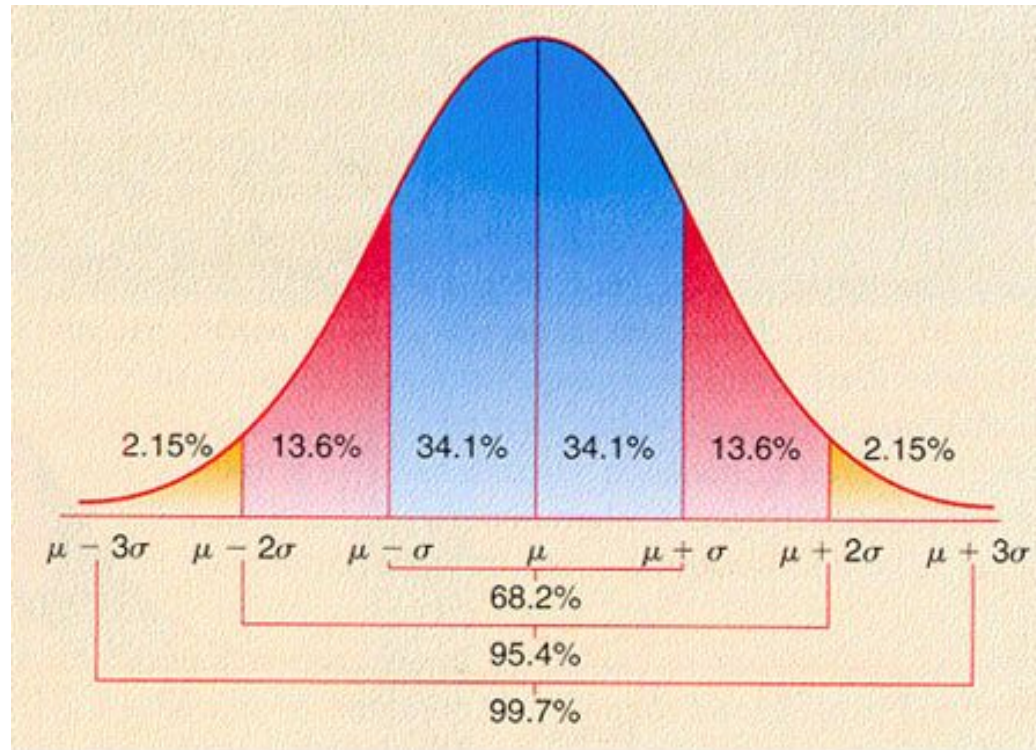
6. «Стандартное отклонение среднего арифметического» *S.E.M. (Standard Error of the Mean)*.

$$S_{\bar{x}} = \frac{S_x}{\sqrt{n}} = \sqrt{\frac{S_x^2}{n}} \quad \equiv \quad \sigma = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \mu)^2}{n}} \quad (5)$$

$\mu$  - истинное значение (или значение по НД) или среднее из бесконечного набора результатов

*S.E.M.* представляет собой приближенную оценку  $\sigma$  (стандартное отклонение), величина  $\sigma$  является более точной:

# Функция распределения случайных величин



$\mu$  - математическое ожидание - значение, частота появления которого является самой большой

# Статистические параметры

## 7. «Доверительный интервал среднего значения».

$$\Delta \bar{x} = t(P, f) \cdot S_{\bar{x}} = \frac{t(P, t) \cdot S}{\sqrt{n}} \quad (6)$$

$$\mu = \bar{x} \pm \Delta \bar{x} = \bar{x} \pm t(P, f) \cdot S_{\bar{x}} = \bar{x} \pm \frac{t(P, t) \cdot S}{\sqrt{n}} \quad (7)$$

$\mu$  - истинное значение измеряемой величины (по ГФ X или ФС) при отсутствии систематической погрешности;

$t(P, f)$  - коэффициент нормированных отклонений Стьюдента (вместо нормального Гауссовского)

$P$  - доверительная вероятность (статистическая надежность) - доля случаев, в которых среднее арифметическое при данном числе определений будет лежать в определенных пределах.

Сопоставление результатов анализа с учетом доверительного интервала:

$$2 \text{ парал.измерений} : \pm \frac{12,71}{\sqrt{2}} S = \pm 9S; \quad 4 \text{ парал.измерений} : \pm \frac{3,18}{\sqrt{4}} S = \pm 1,6S;$$

$$3 \text{ парал.измерений} : \pm \frac{4,30}{\sqrt{3}} S = \pm 2,5S; \quad 5 \text{ парал.измерений} : \pm \frac{2,78}{\sqrt{5}} S = \pm 1,24S.$$

# Статистические методы

1. *Определение нормальности распределения методом Девиды.*

$$PG = \frac{R}{S_x}$$

где, R- размах, PG – статистическая величина

2. *Одновыборочный t-критерий Стьюдента.*

Используется для проверки того, совпадает ли среднее арифметическое значение  $\bar{x}$  с заданным значением

$$PG = \frac{|\bar{x} - \mu|}{S_x} \sqrt{n}$$

3. *Метод Фишера* (метод проверки однородности дисперсий).

$$PG = \frac{S_1^2}{S_2^2}$$

# Статистические методы

Таблица II

Числовые значения критерия Стьюдента и критерия  $\chi^2$

f	$\chi^2(P, f)$ (P = 95%)	Критерий Стьюдента $t(P, f)$ и $t(P, f)$				
		P				
		50%	90%	95%	98%	99%
0	1	2	3	4	5	6
1	3,84	1,000	6,31	12,70	31,82	63,70
2	5,99	0,816	2,92	4,30	6,97	9,92
3	7,82	0,765	2,35	3,18	4,54	5,84
4	9,49	0,741	2,13	2,78	3,75	4,60
5	11,07	0,727	2,01	2,57	3,37	4,03
6	12,59	0,718	1,94	2,45	3,14	3,71
7	14,07	0,711	1,89	2,36	3,00	3,50
8	15,51	0,711	1,89	2,36	3,00	3,50
9	16,92	0,703	1,83	2,26	2,82	3,25
10	18,31	0,700	1,81	2,23	2,76	3,17
15	25,00	0,691	1,75	2,13	2,60	2,95
20	31,4	0,687	1,73	2,09	2,53	2,85
30	—	0,683	1,70	2,04	2,46	2,75
40	—	0,681	1,68	2,02	2,42	2,70
60	—	0,679	1,67	2,00	2,39	2,66
120	—	0,677	1,66	1,98	2,36	2,62
$\infty$	—	0,674	1,64	1,96	2,33	2,58
f	$\chi^2(P, f)$ (P = 95%)	75%	95%	97,5%	99%	99,5%
		P				

Таблица III

Числовые значения критерия Фишера  $F(P, f_1, f_2)$  при P=99%

f <sub>1</sub>	f <sub>2</sub>										
	1	2	3	4	5	6	8	10	12	16	20
1	4052	4999	5403	5625	5764	5859	5981	6056	6106	6169	6208
2	98,49	99,00	99,17	99,25	99,30	99,33	99,36	99,40	99,42	99,44	99,45
3	34,12	30,81	29,46	28,71	28,24	27,91	27,49	27,23	27,05	26,83	26,65
4	21,20	18,00	16,69	15,98	15,52	15,21	14,80	14,54	14,37	14,15	14,02
5	16,26	13,27	12,06	11,39	10,97	10,77	10,27	10,05	9,89	9,68	9,55
6	13,74	10,92	9,78	9,15	8,75	8,47	8,10	7,87	7,72	7,52	7,39
7	12,25	9,55	8,45	7,85	7,46	7,19	6,84	6,62	6,47	6,27	6,15
8	11,26	8,65	7,59	7,01	6,63	6,37	6,03	5,82	5,67	5,48	5,36
9	10,56	8,02	6,99	6,42	6,06	5,80	5,47	5,26	5,11	4,92	4,80
10	10,04	7,56	6,55	5,99	5,64	5,39	5,06	4,85	4,71	4,52	4,41
11	9,65	7,20	6,22	5,67	5,32	5,07	4,74	4,54	4,40	4,21	4,10
12	9,33	6,93	5,95	5,41	5,06	4,82	4,50	4,30	4,16	3,98	3,86
13	9,07	7,70	5,74	5,20	4,86	4,62	4,30	4,10	3,96	3,78	3,67
14	8,86	6,51	5,56	5,03	4,60	4,46	4,14	3,94	3,80	3,62	3,51
15	8,68	6,36	5,42	4,89	4,56	4,32	4,00	3,80	3,67	3,48	3,36
16	8,53	6,23	5,29	4,77	4,44	4,20	3,89	3,69	3,55	3,37	3,25
17	8,40	6,11	5,18	4,67	4,34	4,10	3,79	3,59	3,45	3,27	3,16
18	8,28	6,01	5,09	4,58	4,25	4,01	3,71	3,51	3,37	3,19	3,07
19	8,18	5,93	5,01	4,50	4,17	3,94	3,63	3,43	3,30	3,12	3,00
20	8,10	5,85	4,94	4,43	4,10	3,87	3,56	3,37	3,23	3,05	2,94
25	7,77	5,57	4,68	4,18	3,86	3,63	3,32	3,13	2,99	2,81	2,70
30	7,56	5,39	4,51	4,02	3,70	3,47	3,17	2,93	2,84	2,66	2,55
40	7,31	5,18	4,31	3,83	3,51	3,29	2,99	2,80	2,66	2,49	2,37
60	7,08	4,98	4,13	3,65	3,34	3,12	2,82	2,63	2,50	2,32	2,20

# Валидация фармакопейных методов

## Параметры валидации аналитической методики:

- Правильность (Accuracy)
- Прецизионность (Precision)
  - Сходимость (Repeatability)
  - Внутрилабораторная прецизионность (Intermediate Precision)
- Специфичность (Specificity)
- Линейность (Linearity)
- Робастность (Robustness)
- Диапазон применения (Range)
- Предел обнаружения (Detection Limit)
- Предел количественного определения (Quantitation Limit)

**Все параметры валидации оцениваются с использованием: погрешности и предельных значений анализируемых величин**



# Параметры валидации

**Правильность** характеризует степень соответствия между известным истинным значением (или справочной величиной) и значением, полученным по данной методике.

$\bar{x} - \mu$  - смещение или систематическая погрешность ( $E_{\text{сист.}}$ )

Смещение есть постоянная (систематическая) погрешность, проявляющаяся как постоянное отклонение среднего от истинного значения.

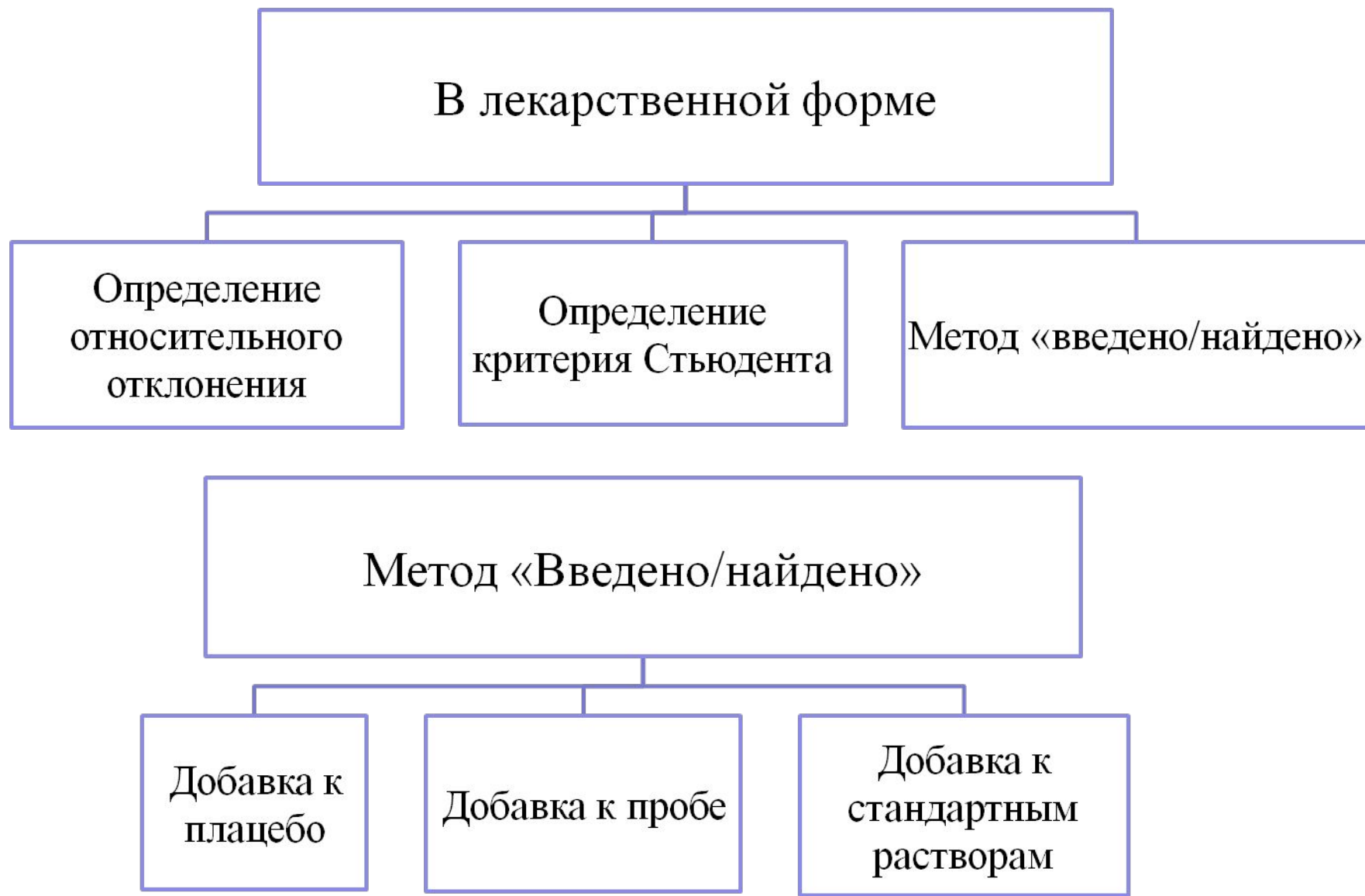
Минимальное смещение определяет правильность.

Правильность изучают в пределах диапазона применения аналитической методики.





# Параметры валидации. Правильность



# Параметры валидации. Правильность

**Пример 1. Определение правильности путем установления относительного отклонения.**

С целью определения правильности метода анализа определили содержание вещества в эталоне ( $m_{\text{практ}}$ ), которое составило 30,9 мг. Заданное содержание вещества в эталоне ( $m_{\text{теор}}$ ) составило 30 мг.

В соответствии со спецификацией относительное отклонение измеренного и заданного значений не должно превышать  $\pm 2\%$ .

$$S_{\text{отн}} = \frac{m_{\text{практ}} - m_{\text{теор}}}{m_{\text{теор}}} \times 100\% = \frac{30,9 \text{ мг} - 30,0 \text{ мг}}{30,0 \text{ мг}} \times 100\% = 3,0\%$$

Относительное отклонение превышает  $\pm 2\%$ , следовательно, *метод не удовлетворяет критерию правильности.*

**Пример 2. Определение правильности методом одновыборочного  $t$ -критерия Стьюдента.**

Для определения правильности аналитического метода анализ эталонной пробы с номинальным значением салициловой кислоты – 250 мкг проводили шесть раз. Согласно полученным результатам, среднее содержание салициловой кислоты – составило 245 мкг, а стандартное отклонение результата измерений  $S_x$  – 2,18 мкг.

$$PG = \frac{|\bar{x} - \mu|}{S} \sqrt{n} = \frac{|245 - 250|}{2,18} \sqrt{6} = 5,61$$

Статистическая величина 5,61 превышает значение 2,57 (табл), следовательно,

*метод не удовлетворяет критерию правильности.*

# Параметры валидации. Правильность

## Пример 3. Определение правильности при введении добавок к плацебо.

Правильность метода подтверждается, если средняя степень обнаружения введенного компонента X составляет от 93 до 103%.

Номер пробы	Введенное количество компонента X, мг	Найденное количество компонента X, мг			Среднее значение, мг	Степень обнаружения, %
1	20	20,3	20,1	20,5	20,3	101,5
2	30	30,3	31,5	30,9	30,9	103,0
3	50	51,4	51,1	51,5	51,3	102,6

$$C_{об} = \frac{m_{\text{практ}}}{m_{\text{теор}}} \times 100\% \quad C_{об}^{ср} = \frac{101,5\% + 103,0\% + 102,6\%}{3} = 102,4\%$$

Среднее значение степени обнаружения соответствует требованиям спецификации и находится в диапазоне от 97 до 103%, значит, *метод удовлетворяет критерию правильности.*

## Пример 4. Определение правильности при введении добавок к пробе.

Номер пробы	Содержание компонента X в пробе, мг	Введенное количество компонента X, мг	Найденное количество компонента X, мг			Среднее значение, мг	Степень обнаружения, %
1	40	20	58,0	58,2	58,4	58,2	91,0
2	40	30	68,5	67,8	68,1	68,1	93,7
3	40	50	89,2	90,2	89,5	89,6	99,2

# *Параметры валидации. Правильность Количественное определение*

## *Активная субстанция*

- а) применение аналитической методики к СО;
- б) сравнение результатов анализа, полученных с использованием валидируемой методики и арбитражного метода, правильность и прецизионность которого известны (использование независимого метода);
- с) заключение о правильности можно сделать после того, как установлены прецизионность, линейность и специфичность.

## *Готовый лекарственный препарат*

- а) применение методики к искусственным смесям, к которым были добавлены известные количества анализируемого вещества;
- б) если невозможно получить образцы всех компонентов лекарственного препарата, возможно применение метода добавок или арбитражной методики, правильность которой доказана;
- с) заключение о правильности можно сделать после того, как установлены прецизионность, линейность и специфичность.

# Параметры валидации. Правильность

## Количественное определение

### Примеси

Правильность изучают на образцах (субстанции или ЛП) с добавленным известным количеством примесей.

Если примеси или продукты разложения недоступны, применяют арбитражный метод. Если примеси неизвестны, то чувствительность их определения может быть принята равной чувствительности определения субстанции. Если чувствительность определения субстанции и примеси существенно отличается, то вводят коэффициент пересчета.

Должен быть указан конкретный способ нормирования содержания отдельной примеси или суммы примесей, например, в массовых процентах, в процентах по отношению к площади пика основного анализируемого компонента или др.

Правильность (%) найденного значения от введенного количества или как разность между  $\bar{x}$  и  $\mu$  с учетом соответствующих доверительных интервалов.

# Параметры валидации.

**Прецизионность** (*Precision*) - аналитической методике выражает степень близости (или степень разброса) результатов для серии измерений, выполненных по данной методике на различных пробах одного и того же однородного образца.

Изучается для методик количественного определения и методик количественного определения примесей.

При изучении прецизионности следует представлять ( $E_{\text{случ.}}$ ):

1) стандартное отклонение ( $S_x$ ),

$$S_x = \sqrt{\frac{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}{f}} = \sqrt{\frac{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

2) коэффициент вариации ( $VK$ ) или относительное стандартное отклонение ( $\%RSD$ ):  $VK(X) = \%RSD = \frac{S_x}{\bar{x}} 100\%$

3) доверительный интервал:

$$\mu = \bar{x} \pm \Delta\bar{x} = \bar{x} \pm t(P, f) \cdot S_x = \bar{x} \pm \frac{t(P, t) \cdot S}{\sqrt{n}}$$

# *Параметры валидации. Прецизионность*

**1. Сходимость (повторяемость)** изучают, выполняя:

- а) не менее девяти определений, охватывающих диапазон применения методики (например, три концентрации / три определения для каждой) или
- б) не менее шести определений для образцов с содержанием анализируемого вещества, близким к номинальному.

## **2. Внутрिलाбораторная прецизионность**

Устанавливают влияние случайных факторов на прецизионность валидируемой аналитической методики.

**3. Воспроизводимость** (разброс результатов измерений относительно среднего значения) оценивают путем проведения межлабораторных исследований при стандартизации аналитической методики (например, при включении методики в фармакопею); отражает степень сходимости результатов, полученных анализом одних и тех же образцов при различных нормальных условиях теста - разные лаборатории, химики-аналитики, инструменты, партии реактивов, температура окружающей среды, различное время проведения анализов и т.п.

# Параметры валидации. Прецизионность

## Пример :

Содержание железа было определено методом спектроскопии в видимой области в условиях повторяемости. При измерении получены следующие значения: 565, 559, 570, 564, 557 и 572 мкг.

Согласно спецификации повторяемость метода подтверждается, если коэффициент вариации составляет менее 1,5%.

Средне арифметическое значение для полученных результатов составило – 564,5 мкг.

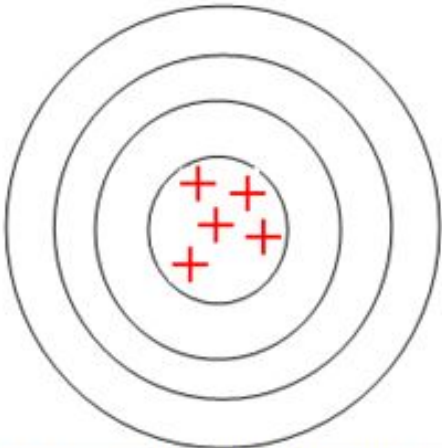
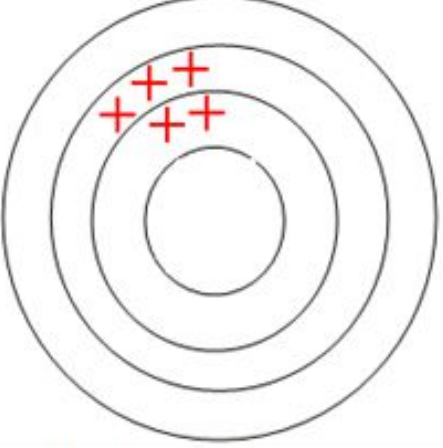
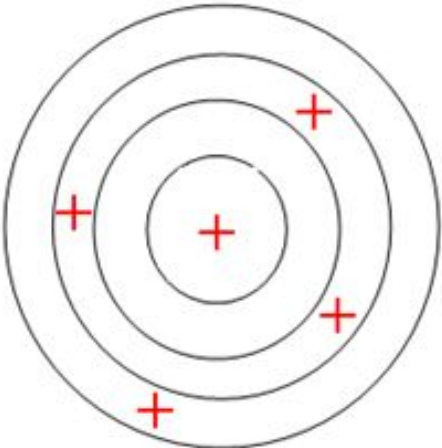
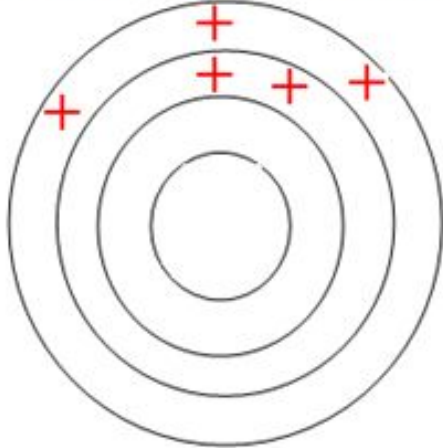
Стандартное отклонение результата измерения ( $S_x$ ) равно 5,89 мкг.

$$VK(X) = \frac{S_x}{x} = \frac{5,89 \text{ мкг}}{564,5 \text{ мкг}} \times 100\% = 1,04\%$$

Коэффициент вариации не превышает 1,5%, следовательно, *повторяемость (сходимость) метода подтверждается.*



# Правильность и Воспроизводимость – разные вещи

	
Результаты правильные и хорошо воспроизводимые	Результаты хорошо воспроизводимые, но неправильные
	
Результаты правильные, но плохо воспроизводимые	Результаты неправильные и плохо воспроизводимые

# Сходимость и Воспроизводимость

<i>Сходимость</i> (внутрилабораторная воспроизводимость)	<i>Воспроизводимость</i> (межлабораторный эксперимент)
Характеризует близость отдельных результатов, полученных:	
Для одного и того же образца	Для одного и того же образца
Одним и тем же методом	Одним и тем же методом
В одних и тех же условиях (аналитик, аппаратура, лаборатория)	В различных условиях (различные аналитики, на разном оборудовании, в разных лабораториях)
В течение короткого промежутка времени	В разное время

$$\text{Воспроизводимость} \equiv \begin{matrix} \text{Случайные} \\ \text{внутрилабораторные} \\ \text{погрешности} \\ \text{(сходимость)} \end{matrix} + \begin{matrix} \text{Систематические} \\ \text{погрешности, присущие} \\ \text{каждой отдельной} \\ \text{лаборатории} \end{matrix}$$

# Параметры валидации.

**Специфичность (Specificity)** – способность однозначно оценивать анализируемое вещество в присутствии других компонентов, которые могут присутствовать в образце (примеси, продукты разложения, вспомогательные вещества и т. д.)

**«специфичность» ≠ «селективность»**

**Недостаток** метода (обычно в случае количественного определения) может компенсироваться другими аналитическими методами.

Специфичность *оценивается* при валидации методов, применяемых для идентификации ЛВ, определения примесей (родственные соединения, тяжелые металлы, летучие органические примеси), установления количественного содержания вещества в образце и ЛФ.

В случае применения хроматографических методов используют параметр **разрешение** (Специфичность метода подтверждается, если пики являются однородными и коэффициент разрешения составляет более 1,5)

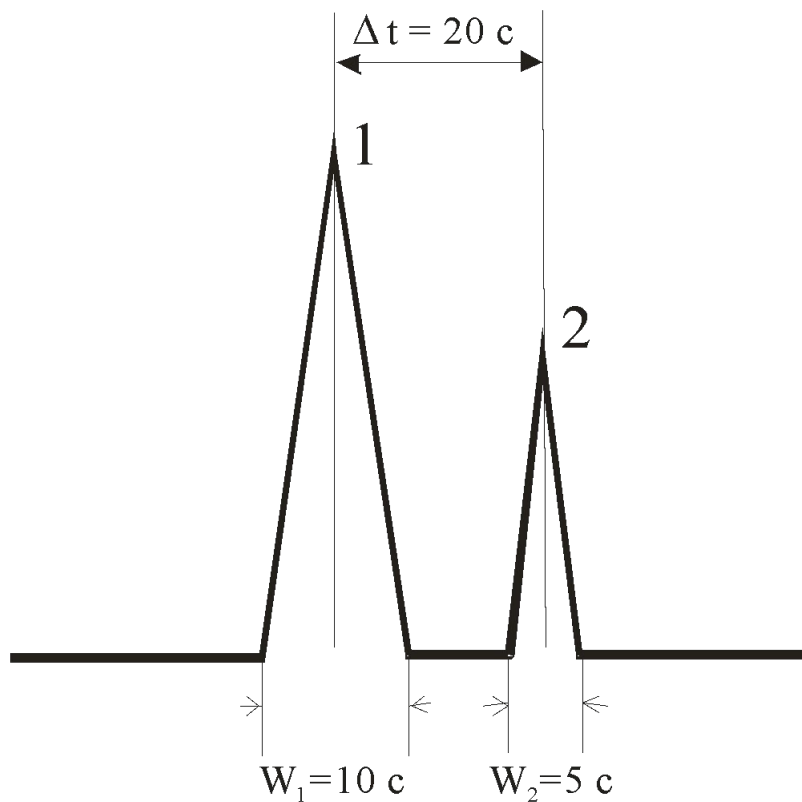
$$R = \frac{2\Delta t}{w_1 + w_2}$$

где:  $R$  – коэффициент разрешения;  $\Delta t$  – разность времен удерживания;  $w_1$  и  $w_2$  – ширины пиков 1 и 2 у основания

# Параметры валидации. Специфичность

## Пример:

При проведении ВЭЖХ анализа компонентов смеси была получена следующая хроматограмма:



$$R = \frac{2 \times 20c}{10c + 5c} = 2,67$$

## Параметры валидации.

**Предел обнаружения** (*Limit of detection*) характеризует минимальное содержание ЛВ в образце, которое может быть обнаружено данным методом.

Предел обнаружения обычно выражается как концентрация ЛВ (например, в % или долях на миллион — ppm) в образце и используется главным образом для испытаний на чистоту.

1. *Визуальная оценка* - для неинструментальных методов предел обнаружения устанавливается путем анализа образцов с известными концентрациями ЛВ.

2. *Соотношение сигнал/шум* - для инструментальных методов, имеющих фоновый сигнал, устанавливается минимальная концентрация, при которой ЛВ может быть достоверно обнаружено. В таких случаях соотношение аналитического сигнала анализируемой пробы и фона должно составлять **2:1** или **3:1**.

## Параметры валидации. Предел обнаружения

3. Использование калибровочной прямой и стандартного отклонения аналитического сигнала - для инструментальных методов .

Предел обнаружения (ПО) может быть выражен как:

$$ПО = \frac{3,3 \times \sigma}{S}$$

где:  $\sigma$  — стандартное отклонение сигнала,  $S$  — тангенс угла наклона калибровочной прямой.

Значение тангенса угла наклона калибровочной прямой вычисляют из калибровочной прямой для анализируемого вещества. Оценка стандартного отклонения сигнала может быть проведена разными способами.

# *Параметры валидации.*

## *Предел количественного определения*

*Предел количественного определения (Quantitation limit)* — это минимальное количество ЛВ, которое может быть определено с приемлемой правильностью и прецизионностью.

Это характеристика определения малых концентраций веществ в образце (например, примесей или продуктов деградации) (в % , ppm).

*1. Визуальная оценка* Устанавливается путем анализа образца с известной концентрацией определяемого вещества и определением его минимального количества.

*2. Соотношение сигнал/шум* - для инструментальных методов, характеризующихся фоновыми помехами, устанавливается минимальная концентрация, при которой определяемое вещество достоверно может быть определено количественно. Допустимое отношение «сигнал/помеха» **10 : 1**.

# Параметры валидации. Предел количественного определения

3. Использование калибровочной прямой и стандартного отклонения аналитического сигнала - для инструментальных методов .

Предел обнаружения (ПО) может быть выражен как:

$$ПО = \frac{10 \times \sigma}{S}$$

где:  $\sigma$  — стандартное отклонение сигнала,  $S$  — тангенс угла наклона калибровочной прямой.

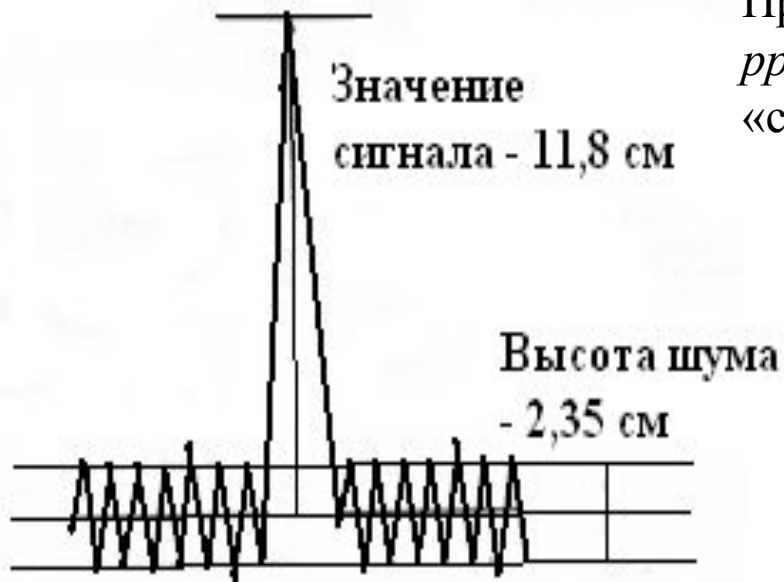
Значение тангенса угла наклона калибровочной прямой вычисляют из калибровочной прямой для анализируемого вещества. Оценка стандартного отклонения сигнала может быть проведена разными способами.



# Параметры валидации. Предел количественного определения

## Пример.

В методе ВЭЖХ раствор с концентрацией 100 *ppm* вводился в систему при наибольшей чувствительности. На полученной хроматограмме (рис. 3) была измерена высота пика пробы, которая составила 11,8 см и высота шума (нулевой линии) – 2,35 см. В соответствии со спецификацией предел количественного определения должен быть меньше минимально ожидаемой концентрации вещества в 50 *ppm*.



При концентрации 100 *ppm* соотношение «сигнал/шум» равно:

$$\frac{11,8\text{см}}{2,35\text{см}} = 5,0$$

$$ПО = \frac{3,3}{5,0} \times 100 \text{ ppm} = 65,7 \text{ ppm}$$

$$ПКО = 3 \times 65,7 \text{ ppm} = 197 \text{ ppm}$$

*Предел количественного определения метода составляет выше 50 ppm и не может быть принят.*

## *Параметры валидации.*

**Линейность** (*Linearity*) это способность методики (в пределах диапазона применения) получать результаты испытаний, прямо пропорциональные концентрации (количеству) анализируемого вещества в образце.

Линейность результатов может быть представлена графически в виде зависимости аналитических сигналов от концентрации вещества (не менее 5). Для оценки линейности метода рассчитывают коэффициент корреляции  $r$  и меру определенности  $R$ .

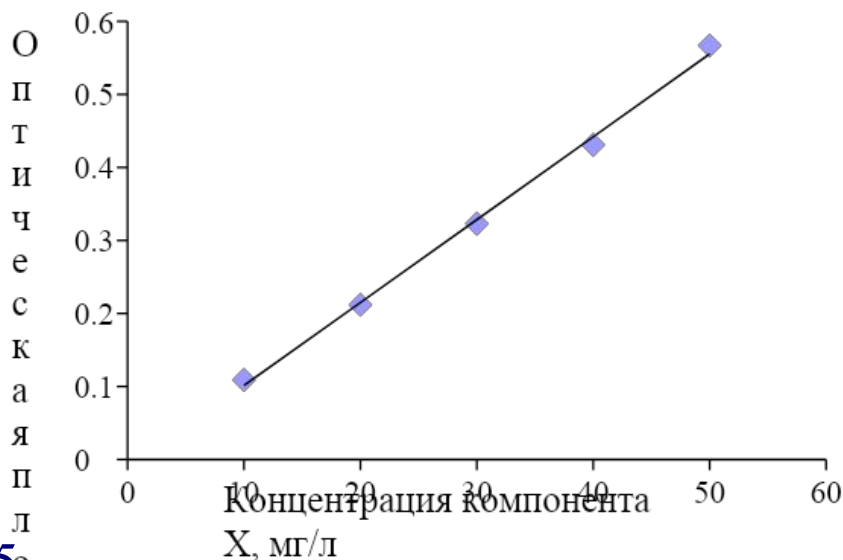
**Аналитическая область**, в пределах которой соблюдается линейная зависимость, охватывает интервал между верхним и нижним пределами анализируемого вещества (включая эти пределы), в интервале которых данный метод обеспечивает его определение с требуемыми прецизионностью и правильностью. Аналитическая область обычно выражается в тех же единицах, что и результаты испытаний, полученные с помощью данной методики (в %, ppm).

# Параметры валидации. Линейность

## Пример.

Необходимо определить линейность спектрофотометрического метода. Для этого были найдены оптические плотности калибровочных растворов с различной концентрацией компонента X.

Концентрация компонента X, мг/л	Оптическая плотность
10	0,109
20	0,212
30	0,323
40	0,431
50	0,567



Параметром линейности так же является мера определенности (R), равная коэффициенту корреляции, возведенному в квадрат (r).

Значения коэффициента корреляции -0,9986, значение меры определенности – 0,9973.

В соответствии со спецификацией, линейность метода подтверждается, если значение меры определенности более 0,998.

*Линейности метода не подтверждена.*

## Параметры валидации.

**Диапазон применения (range) или рабочий диапазон-** аналитической методики является интервал между минимальной и максимальной концентрациями (количествами) анализируемого вещества в образце (включая эти концентрации), для которого показано, что аналитическая методика имеет требуемую прецизионность, правильность и линейность.

-для количественного содержания анализируемого вещества в образце или лекарственной форме — 80—120% от определяемой величины;

-для показателя «Однородность дозирования по содержанию» — 70—130% от определяемой величины; или более широкий интервал в соответствии с природой дозированной формы (например, дозированный ингалятор);

-для показателя «Растворение» —  $\pm 20\%$  от предела, регламентированного НД (например, если для таблеток с контролируемым высвобождением нормируется предел от 20% — через 1 ч и до 90% — через 24 ч, то валидированная аналитическая область должна охватывать интервал 0 — 110% от регламентируемых норм);

-для содержания примесных продуктов — 50—120% от нормируемых пределов.

## *Параметры валидации.*

**Робастность** (Robustness) – оценка особенности и специфики проведения анализа и стандартизации условий анализа.

Типичные примеры изучаемых параметров робастности:

- устойчивость во времени аналитических растворов;
- время экстракции.

В случае жидкостной хроматографии:

- рН подвижной фазы;
- состав подвижной фазы;
- колонки (различные серии и/или поставщики);
- температура;
- скорость подвижной фазы.

В случае газовой хроматографии:

- колонки (различные серии и/или поставщики);
- температура;
- скорость газа-носителя.

## *Схемы валидации*

- **Категория 1** — аналитические методы для количественного определения лекарственных веществ или активных ингредиентов (включая консерванты) в готовых лекарственных формах.
- **Категория 2** — аналитические методы для определения примесей в лекарственных веществах или продуктах деградации в готовых лекарственных формах. Эти методы включают количественную оценку и лимитирующие тесты (limit tests).
- **Категория 3** — аналитические методы для определения характеристических параметров (например, растворение, высвобождение лекарственного вещества).
- **Категория 4** — методы для идентификации вещества.

Для каждой категории методов необходима различная аналитическая информация.

# Валидация фармакопейных методов

## ПАРАМЕТРЫ ВАЛИДАЦИИ АНАЛИТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ

Аналитические характеристические параметры	Категория 1	Категория 2 (примеси)		Категория 3	Категория 4
	количественное определение	количественное определение	лимитирующие тесты	растворение	идентификация
Правильность	Да	Да	*	*	Нет
Прецизионность	Да	Да	Нет	Да	Нет
Специфичность	Да	Да	Да	*	Да
Предел обнаружения	Нет	Нет	Да	*	Нет
Предел количественный	Нет	Да	Нет	*	Нет
Линейность	Да	Да	Нет	*	Нет
Аналитическая область	Да	Да	*	*	Нет

\* Может быть необходим в зависимости от природы специфического теста.

# Валидация фармакопейных методов

Валидационные параметры	Идентичность	Качественное содержание примесей	Количественное содержание примесей	Количественное определение
Специфичность	+	+	+	+
Линейность	-	-	+	+
Диапазон применения	-	-	+	+
Правильность	-	-	+	+
Сходимость	-	-	+	+
Воспроизводимость	-	-	+	+
Предел обнаружения	-	+	-	-
Предел количественного определения	-	-	+	-



# Валидация фармакопейных методов

## Протокол валидации

Должен **включать** следующие **вопросы**:

- Описание метода, который должен быть валидирован.
- Программу проведения валидации.
- Параметры, подлежащие оценке.
- Параметры окружающей среды.
- Рабочие параметры.
- Необходимые тесты.
- Контроль оборудования и его работы.
- Описание или ссылку на методы, которые должны использоваться для измерения каждого параметра.
- Формы сбора данных или стандартные формы отчетов по ре-
- Предельные диапазоны оцениваемых параметров.
- Обязанности по выполнению задач валидации с указанием (если возможно) сроков исполнения.

К протоколу прилагаются результаты испытаний и отчеты о валидации.