

Валидация аналитических методов: практическое применение.

Писарев В.В., к.х.н., MBA, заместитель генерального директора ФГУП «Государственный научный центр по антибиотикам», Москва (www.pisarev.ru)

Введение

В соответствии с современными требованиями к производству лекарственных средств необходимо использование валидированных аналитических методов. Валидация аналитического метода проводится как при внедрении новой методики при разработке новых лекарственных средств, так и при изменении условий анализа лекарственных средств. Практической ценностью валидации является то, что в процессе разработки новых методик можно своевременно выявить их недостатки и на ранних стадиях существенно улучшить методику. Практика валидационных экспериментов дает понимание сути методики и осознание необходимости строгого соблюдения ее параметров. В результате, при последующей эксплуатации валидированной методики значительно снижается вероятность ошибок.

Существует много отечественных и международных нормативных документов описывающих процедуру валидации, при этом возникает путаница в терминологии и критериях оценки результатов. Данная статья основывается на ГОСТ Р ИСО 5725-1-2002 «Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений» и фармакопее США. Приводится описание валидационной процедуры для подлинности и количественного определения (включая примеси) методом ВЭЖХ. Перечень определяемых валидационных параметров приведен в Таблице №1.

Таблица №1.

Перечень определяемых валидационных параметров

Показатель	Правильность	Сходимость	Межлабораторная воспроизводимость	Линейность	Предел количественного определения	Специфичность
Подлинность	нет	нет	нет	нет	нет	да
Посторонние примеси	да	да	да	да	да	да
Количественное определение	да	да	да	да	нет	да

Проведение валидации

1. Правильность аналитического метода характеризует близость результатов испытаний, полученных данным методом, к истинному значению.

Показателем правильности метода обычно является значение систематической погрешности.

Систематическая погрешность выражается как разность между математическим ожиданием результатов измерений и истинным значением.

При количественном определении лекарственного вещества этот параметр может быть установлен путем применения аналитического метода к анализируемому объекту с использованием стандарта известной степени чистоты. В случае количественного определения вещества в лекарственной форме правильность аналитической методики устанавливается по результатам ее применения к анализу модельной смеси, включающей все компоненты лекарственной формы и известное количество определяемого вещества.

Правильность метода количественного определения идентифицированных примесных соединений устанавливается по результатам анализа методом добавок. При отсутствии образцов примесных соединений или в тех случаях, когда структура их не установлена, правильность предлагаемой методики их определения должна быть подтверждена результатами анализа другой аналитической методикой с охарактеризованной правильностью.

Правильность оценивается на основе не менее 9 результатов определений на минимум 3 уровнях концентраций в пределе аналитической области (например, 3 повторности определения для 3 аналитических концентраций). Обычно готовят по три модельные смеси для каждой из трех концентраций: 80, 100 и 120%:

Критерий приемлемости: процент восстановления при использовании концентраций 80, 100 и 120%, скорректированный на 100%, должен находиться в пределах от 98,0% до 102,0%.

Процент восстановления (R):

$$R = \frac{A}{B} \times 100\%, \text{ где } R \text{ (Recovery) - выход, } A \text{ - измеренное содержание, } B \text{ - заданный}$$

(фактический) уровень

2. Прецизионность аналитического метода характеризует степень близости независимых результатов индивидуальных испытаний, полученных в конкретных установленных условиях. Эта характеристика зависит только от случайных факторов и не связана с истинным значением измеряемой величины. Она выражается величиной стандартного отклонения — коэффициентом вариации. Экстремальные показатели прецизионности —сходимость и воспроизводимость.

Прецизионность аналитического метода устанавливается по результатам определений такого количества аликвот однородного образца, которое позволяет рассчитать величину коэффициента вариации. Фармакопея США рекомендует оценивать прецизионность по результатам определения не менее 6 определений при анализе 100% концентрации, которые позволят статистически рассчитать эти параметры.

Среднее квадратичное отклонение (S) и коэффициент вариации (CV) служат характеристикой случайных погрешностей и используются для оценки сходимости и воспроизводимости измерений. Коэффициент вариации является отношением среднеквадратичного отклонения к среднеарифметическому значению результатов n измерений:

$$S = \frac{\sum_{i=1}^n (x - \bar{x})^2}{n-1} ; \quad \bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^n X}{n} ; \quad CV = \frac{S}{\bar{X}} \times 100\% ;$$

где x – результат отдельного определения; \bar{x} – среднее арифметическое всех определений, n – число определений, S – среднеквадратичное отклонение, CV – коэффициент вариации.

2.1. Сходимость характеризует степень согласованности результатов измерений (испытаний), полученных одним и тем же методом на идентичных объектах испытаний, в одной и той же лаборатории, одним и тем же оператором, с использованием одного и того же оборудования, в пределах короткого промежутка времени.

Степень согласования результатов при анализах однородного образца, выполненных одним аналитиком при одних и тех же условиях (реактивы, оборудование, обстановка и др.), и в течение короткого промежутка времени

Требуемое количество последовательных хроматограмм от 3 до 6.

Критерий приемлемости: коэффициент вариации параллельных определений для 6 измерений должно быть не более 2%.

2.2. Воспроизводимость характеризует меру совпадения результатов измерений, полученных одним и тем же методом, на идентичных образцах, в разных лабораториях, разными операторами, с использованием различного оборудования, относительно длинный промежуток времени между измерениями, отдельные, предположительно идентичные образцы, взятые из одной партии материала

Критерий приемлемости: определяется коэффициент вариации в каждом из уровней точности. Критерий инструментальной воспроизводимости – 1 %, внутрилабораторной воспроизводимости – 2 % для количественного определения основного компонента, для примесей на пределе определения – 5 и 10 %.

3. Специфичность аналитического метода определяется его способностью достоверно определять лекарственное вещество в присутствии примесных соединений, продуктов деградации и вспомогательных веществ. Недостаток аналитического метода (обычно в случае количественного определения) может компенсироваться другими аналитическими методами. Специфичность оценивается при валидации методов, применяемых для идентификации лекарственных веществ, определения примесей (родственные соединения, тяжелые металлы, летучие органические примеси), установления количественного содержания вещества в образце и лекарственной форме.

В испытаниях на подлинность аналитический метод должен обеспечивать идентификацию лекарственного вещества в присутствии других соединений близкой химической структуры. Это должно быть подкреплено получением положительных результатов (путем сравнения со стандартом) анализа образца, содержащего лекарственное вещество, а также отрицательными результатами анализа образца, не содержащего такого вещества, для подтверждения того, что положительный результат не может быть обусловлен присутствием других, сходных по строению с ним веществ.

В тех случаях, когда примесные соединения и продукты деградации не идентифицированы

или их стандартные образцы отсутствуют, специфичность аналитического метода должна быть обоснована результатами определений другим, независимым валидированным методом. В этом случае анализируемые образцы следует подвергать стрессовым воздействиям (свет, температура, влажность, кислотный/щелочной гидролиз, окисление).

При количественном определении примесей специфичность метода может быть доказана добавлением к лекарственному веществу соответствующих количеств примесей или вспомогательных веществ для доказательства того, что присутствие этих веществ не влияет на результат анализа.

В случае использования хроматографических методов подтверждением специфичности метода служит показатель разрешения (R_s). Этот показатель характеризует способность системы разделить два компонента.

$$R_s = \frac{1,18(t_{Rb} - t_{Ra})}{b_{0,5a} + b_{0,5b}}, \text{ где}$$

$t_{Rb, Ra}$ - расстояния в мм по осевой между точкой введения и перпендикулярами, опущенными с максимумами двух смежных пиков,

$b_{0,5a, 0,5b}$ - ширина пиков в мм на половине высоты.

Критерий приемлемости: примеси активного вещества, вспомогательных веществ и растворителя для исследуемого образца не должны препятствовать количественному определению основного вещества. Разрешение пика определяемого компонента с любым соседним пиком пробы должно быть более 1.5.

4. Предел количественного определения — это минимальное количество анализируемого вещества, которое может быть определено с приемлемой правильностью и прецизионностью. Это характеристика методов количественного определения малых концентраций веществ в образце (например, примесей или продуктов деградации в лекарственном веществе). Предел количественного определения выражается как концентрация анализируемого вещества в образце (в % , ppm).

Для неинструментальных и инструментальных методов эта характеристика обычно устанавливается путем анализа образца с известной концентрацией определяемого вещества и определением его минимального количества, которое может быть рассчитано с приемлемой правильностью и прецизионностью. Для официальных методов путем анализа образцов с известной концентрацией определяемого вещества выше и ниже требуемого предела необходимо показать, что предел количественного определения достаточно низок. Например,

если требуется определить примесь на уровне 0,1 мг в таблетке, необходимо экспериментально доказать возможность ее достоверного определения в таком количестве с использованием данного аналитического метода.

Предел количественного определения должен быть валидирован путем анализа необходимого числа образцов с концентрацией определяемого вещества, близкой к значению этого параметра.

Расчет предела количественного определения по калибровочной прямой:

$$QL = \frac{10SD}{b},$$

где QL (limit of quantitation) – предел количественного определения, S – стандартное отклонение, b – наклон калибровочной кривой.

S определяется:

А) по калибровочной кривой по остаточному отклонению регрессионной линии, используя образцы аналита в предполагаемом диапазоне предела количественного определения.

Б) по стандартному отклонению регрессионной линии в точке пересечения с осью Y.

5. Линейность устанавливается на основании результатов испытаний, которые пропорциональны концентрации анализируемого вещества в образце в пределах аналитической методики. Линейность результатов может быть представлена графически в виде зависимости аналитических сигналов от концентрации вещества (не менее 5).

Для подтверждения линейности аналитической методики используются следующие параметры: коэффициент регрессии, угол наклона линии регрессии и остаточная сумма площадей.

Определение обычно проводят на растворах с концентрациями 80, 90, 100, 110 и 120 %.

Критерий приемлемости: методика считается линейной, если коэффициент корреляции между рядом полученных значений будет не ниже 0,995.

В данной статье не рассматривается валидационный показатель устойчивости методики, тк он требует особого внимания. Стоит, однако, отметить необходимость проверки пригодности хроматографической системы для уже разработанных методик. Тест пригодности является практическим результатом изучения устойчивости методики.

Пригодность системы — интегральная часть многих аналитических методик, которая показывает надежность анализа в заданных условиях его проведения. Параметры пригодности системы обеспечивают соблюдение валидности метода в тех случаях, когда в процессе анализа возможны некоторые внутрилабораторные изменения условий анализа. Например, для метода высокоэффективной жидкостной хроматографии в наибольшей степени подвергаются изменениям стабильность аналитических растворов, рН подвижной фазы, ее состав, различные серии колонок, температура, скорость потока. Тесты пригодности системы зависят от типа метода.

Оформление валидационного отчета

Валидность аналитического метода должна быть установлена и подтверждена лабораторными исследованиями. Документация об успешном завершении таких исследований должна быть предоставлена в протоколе о валидации анализа. Наличие стандартных операционных процедур является существенной частью валидированного аналитического метода.

В протокол валидации методики рекомендуется включать следующее:

- цель валидации
- список исполнителей
- сроки выполнения
- тип анализируемых веществ
- детальную информацию о реактивах, эталонах и приготовлении стандартных образцов
- перечень оборудования и его функциональных и эксплуатационных характеристик
- детали условия проведения экспериментов, включая подготовку пробы
- процедуры вычислений и статистической обработки результатов
- Критерий приемлемости валидации;
- процедуры для контроля качества в процессе эксплуатации методики (например, испытания пригодности системы)
- графическую информацию, например хроматограммы, спектры и калибровочные кривые
- резюме и заключения.