



ФГБУ «НЦЭСМП»
Минздрава России



PerLek

Представление материалов по валидации аналитических методик в регистрационном досье, примеры оформления

Кулешова Светлана Ивановна,
начальник лаборатории антибиотиков
Испытательного центра экспертизы качества
лекарственных средств
25 апреля 2023 г

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»
Министерства здравоохранения Российской Федерации



- ✓ **Валидация аналитической методики** – экспериментальное доказательство пригодности методики для решения предполагаемых задач. Документированный процесс определения аналитических требований и подтверждения соответствия методики её целевому назначению.
 - *Лаборатория должна подтверждать пригодность нестандартных методов, методов, разработанных самой лабораторией, а также стандартных методов, используемых за рамками их предполагаемой области применения или модифицированных на иных основаниях методов. Полнота валидации зависит от необходимости соответствовать потребностям данного применения или области применения. (ISO/IEC 17025:2017)*
- ✓ **Верификация** – процесс подтверждения подлинности данных и оценка возможности использования методики по назначению в реальных условиях её применения



1. Статус методики

(методика, разработанная в лаборатории, расширение и модификация аттестованной методики, валидированная методика, которую предполагается использовать за пределами целевой области её применения и т.д.).

2. **План валидации/протокол** (цель исследования (полная валидация методики, верификация рабочих характеристик аттестованной методики), объем валидационного исследования, т.е. рабочие характеристики, которые предполагается оценить, объем экспериментальных работ, метрологические параметры оценки результатов.

3. **Протокол валидации. Этапы и экспериментальные процедуры в соответствии с планом. Отчет.**

4. **Подведение итогов и обобщение результатов**, на основании которых делается вывод о соответствии или несоответствии методики целевому назначению.



1. Введение (общие положения, цель) .

Название методики, статус. Полноценное описание методики с формулами расчета при их использовании. Перечень оборудования, материалов и реактивов, стандартных и испытываемых образцов. Исполнители. Литературные источники.

Химическое наименование активной фармацевтической субстанции или субстанций, информация о лекарственной форме, методика испытания, результаты предварительных исследований на стадии разработки методики (робастность).



2. Результаты валидации методики.

Рабочие характеристики, краткое объяснение сути характеристики, специфические требования, эксперименты, обработка полученных результатов с приложением иллюстративного материала, подтверждающего полученные данные, выводы по результатам эксперимента. Каждая рабочая характеристика представляется в отдельном пункте.

Стабильность растворов, интерференция фильтров.

3. Пригодность хроматографической системы.



1. Идентификация сотрудников, выполняющих процедуру валидации методики

Этапы валидации	Должность	Ф.И.О,
План валидации/протокол
Получение экспериментальных результатов в соответствии с протоколом, рабочие характеристики (отдельный раздел для каждого параметра, оценка результатов)	1. 2
Отчет, итоговое заключение
Утверждение план/отчет



Реактивы и материалы (Стандартные и испытываемые образцы)

Наименование	Производитель, квалификация	Серия	Чистота	Срок годности
Офлоксацин - стандартный образец	EP CRS	3	Не применимо	Valid

Оборудование

Наименование	Производитель, идентификационный номер	№ свидетельства о поверке/аттестации	Дата поверки/аттестации	Дата следующей
Весы электронные/Mettler Toledo/XS...	3547	35	21.04.2022	21.04.2023



Способность сохранять найденные для нее в оптимальных (номинальных) условиях характеристики при вероятных небольших отклонениях от этих условий проведения анализа.

Общими вариациями параметров :

- а) стабильность растворов, используемых в аналитических методиках;
- б) время экстрагирования.

Параметры вариации для жидкостной хроматографии:

изменение рН подвижной фазы, изменение состава подвижной фазы; разные колонки (разные серии и поставщики); температура; скорость подвижной фазы (скорость потока).

Параметры вариации для биологических методик:

Партии реагентов, буферные компоненты, время инкубации, условия инкубации, время реакции, влияние деградации образца



Степень пригодности методики для определения конкретных соединений в лекарственных средствах, т.е. независимо от других веществ (примеси, продукты деградации, вспомогательные вещества, матрица (среда) и др.), присутствующих в испытуемом образце.

Хроматографические/спектрофотометрические методы

Качественная оценка – хроматограммы/спектры (*указание индивидуальных компонентов*) определяемого вещества, растворителя, плацебо, подвижной фазы (при необходимости), отдельных примесей, продуктов искусственной деструкции. *Количественная оценка* – при обнаружении интерференции введение корректировочных поправок в расчетные формулы.

Микробиологические методы

Качественные тесты – оригинальные питательные среды – подтверждение, что данная среда способна обеспечить рост микроорганизмов/конкретного микроорганизма.



Согласно ИСН Линейность аналитической методики – это её способность (в пределах заданного диапазона) получать результаты, прямо пропорциональные концентрации (количеству) анализируемого вещества в образце.

Анализ растворов определяемого соединения различных концентраций в зависимости от конкретной методики. Привести хроматограммы/спектры, калибровочный график.

Регрессионное уравнение, полученное методом наименьших квадратов, Коэффициент корреляции, b – наклон калибровочного графика, a – пересечение с осью Y , свободный член не должен превышать $\pm 10\%$ от площади пика на хроматограмме стандартного раствора с концентрацией 100% .



- ❖ Количественное определение действующего вещества в ЛС - от 80 до 120 процентов от номинальной концентрации (содержания).
- ❖ Однородность дозирования - от 70 до 130 процентов.
- ❖ Определение примесей - от предела обнаружения примеси до 120-процентного значения, указанного в спецификации.
- ❖ *Для примесей, обладающих чрезвычайно сильным действием или имеющих токсический, или непредвиденный фармакологический эффект, предел обнаружения и предел количественного определения должны быть соразмерны тому уровню, на котором эти примеси должны контролироваться.*



№	Концентрация, %, мг/мл и т.д.	Содержание, %,мг и т.д.	Площадь	№ рис.
1	С	В	3262	1-1
2	2С	2В	6514	1-2
3	4С	4В	1294	1-3
4	8С	8В	26096	1-4

Для установления линейности рекомендуется использовать от 5 до 9 концентраций. Рассчитывают коэффициент корреляции, $|r| \geq 0,99$, отрезок отсекаемый от оси Y менее 2,0 %; должен быть приложен график со всеми экспериментальными данными



Правильность измерений – отражение близости среднего арифметического результатов измерений (полученных в соответствии с методикой) к опорному значению величины.

Точность – близость единичного результата к опорному значению (международный словарь по метрологии)

Подходы к оценке правильности.

Применение искусственных смесей компонентов лекарственного препарата, в которые было добавлено заранее известное количество определяемого вещества (Метод плацебо, метод добавок, в обоих случаях добавляется определяемое вещество в соответствии с требуемым уровнем концентрации (например 80, 100, 120 от номинала)

(Оценка – расчет процента нахождения добавленного вещества, стандартного отклонения, доверительного интервала среднего значения)





Подходы к оценке правильности.

Метод сравнения - сравнение результатов анализа, полученных с использованием валидируемой аналитической методики, и результатов, полученных с помощью методики, правильность которой известна, и (или) независимой методики.

Оценка на основании расчета статистических показателей (например, F-, t-критерии)

Статистическая оценка свободного члена уравнения регрессии (a) при определении линейности валидируемой методики.

Статистически достоверно не должно отличаться от 0.

Должна быть установлена для всего диапазона применения аналитической методики.





Результаты анализа модельных смесей

№ раствора, i	Навеска	% к концентраци и раствора сравнения, X	Площадь пиков/опти- ческие плотности	% результат к concentra- ции раство- ра сравне- ния, Y	% к введенному В = $100 \times (Y_i / X_i)$	№ рис.
------------------	---------	--	---	--	--	--------

Рассчитывают относительно стандартное отклонение (RSD – не более 2,0%); требование к RSD может определяться конкретной методикой, Для количественного определения микробиологическим методом (RSD_{мин} – не более 5,0%). Коэффициент возврата (зависит от концентрации определяемого соединения в анализируемом образце). При 100% – 98-102%, 0,1-1,0 (для примесей) – 95-105%.



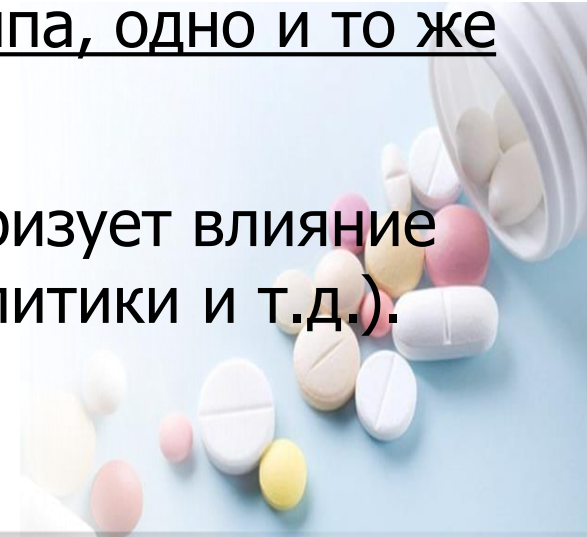


Прецизионность методики характеризуется рассеянием результатов, получаемых с ее использованием, относительно величины среднего результата, т.е. близость результатов измерений к друг другу.

1. Использование однородных аутентичных образцов.
2. Прецизионность аналитической методики, как правило, выражается величиной стандартного отклонения или коэффициента вариации серии измерений.

Повторяемость (сходимость) характеризует прецизионность методики при её выполнении в одних и тех же условиях (один аналитик или группа, одно и то же оборудование) в течение небольшого промежутка времени.

Внутрилабораторная (промежуточная) прецизионность характеризует влияние внутрилабораторных вариаций (различные дни, различные аналитики и т.д.).





Сходимость

№ пробы образца	Площадь/оптическая плотность/Объем титранта	Площадь/оптическая плотность/Объем титранта	№ рисунка (хроматограммы, спектры, кривые титрования и т.д.)
-----------------	---	---	--

Оценка по RSD: КО – не более 2,0% (хим. тесты), не более 5,0% (биол. тесты).
Примеси (от норм.) – не более 15,0%.

Промежуточная или внутрилабораторная

№ пробы образца	Экспериментатор, Э1			Экспериментатор, Э2			Критерии Фишера (P-95 %)
	Прибор 1			Прибор 2			
	Отклик	Результат	№ рис.	Отклик	Результат	№ рис.	

Стандартное отклонение для результатов, полученных Э1 и Э2
RSD – сравнение по критерию Фишера





Проверка стабильности раствора ... в течение определённого промежутка времени с указанием условий хранения.

Время час	Площадь пика	Число теоретических тарелок	Коэффициент симметрии	Количественное определение, %	№ хроматограмм
-----------	--------------	-----------------------------	-----------------------	-------------------------------	----------------

Оценки пригодности хроматографической системы на соответствие установленным критериям, расчет относительного стандартного отклонения для результатов количественного определения. Подтверждение срока годности испытуемого и стандартного растворов, подвижной фазы одновременно.





▪ Наименьшее количество (концентрация) определяемого вещества в пробе, которое может быть количественно оценено с использованием валидируемой методики с требуемой правильностью и внутрилабораторной прецизионностью. Необходимо указать предел количественного определения и метод его определения с подтверждением анализа достаточного числа проб.

▪ Количественная оценка - оценка анализа по соотношению "сигнал/шум" (методы, где наблюдается шум базовой линии).
Определение отношения "сигнал/шум" проводится методом сравнения сигналов, полученных от проб с известными низкими концентрациями, с сигналами, полученными от холостых проб, и установления минимальной концентрации, при которой определяемое вещество может быть достоверно обнаружено. Для оценки предела обнаружения приемлемой считается величина отношения "сигнал/шум" 10:1.



Предел обнаружения (LOD)



- Наименьшее количество (концентрация) определяемого вещества в пробе, которое может быть хотя бы приблизительно оценено с использованием валидируемой методики.

Визуальная оценка - анализ проб с известными концентрациями определяемого вещества и определение его минимального содержания, при котором оно достоверно обнаруживается (Определение примесей методом ТСХ).

Количественная оценка - оценка анализа по соотношению "сигнал/шум" (методы, где наблюдается шум базовой линии). *Определение отношения "сигнал/шум" проводится методом сравнения сигналов, полученных от проб с известными низкими концентрациями, с сигналами, полученными от холостых проб, и установления минимальной концентрации, при которой определяемое вещество может быть достоверно обнаружено. Для оценки предела обнаружения приемлемой считается величина отношения "сигнал/шум" от 3:1 до 2:1.*



Предел обнаружения (LOD)

При наличии в валидационных материалах предела обнаружения необходимо указывать и метод его определения. Если определение предела обнаружения основано на визуальной оценке или оценке отношения «сигнал/шум», представление соответствующих хроматограмм считают достаточным для его обоснования.

Если значение предела обнаружения получено путем расчета или экстраполяции, оценка должна быть подтверждена посредством независимого испытания достаточного количества образцов с содержанием определяемого вещества, соответствующим пределу обнаружения или близким к нему по значению.



Предел обнаружения (LOD)



Наименование компонента	Предел обнаружения			Предел количественного определения		
	Концентрация (%)	Соотношение «Сигнал/шум»	№ рис.	Концентрация (%)	Соотношение «Сигнал/шум»	№ рис.
Примесь А	0,015	8	1	0,05	14	1-1
Примесь В	0,012	6	2	0,06	15	1-2



1. ГФ РФ XIV изд.
 - 1.1. ОФС.1.1.0012.15 (Валидация аналитических методик)
 - 1.2. ОФС 1.1.0021.18 (Валидация микробиологических методик)
2. Фармакопея ЕАЭС
 - 2.1. ОФС 5.31. Валидация аналитических методик
3. Руководство по валидации аналитических методик проведения испытания лекарственных средств, утверждено Решением Евразийской экономической комиссии от 17 июля 2018 г. № 113



4. Руководство по валидации методик анализа лекарственных средств (методические рекомендации). Под редакцией: Н.В. Юргеля, А.Л. Младенцева, А.В. Бурдейна, М.А. Гетьмана, А.А. Малина, В.В. Косенко.

В сб. Руководство для предприятий фармацевтической промышленности / методические рекомендации. М.: Издательство «Спорт и Культура-2000», 2007. Ч. 1. 92 с.

5. Валидация аналитических методик для производителей лекарственных средств.

Перевод с немецкого под редакцией В.В. Береговых. М.: Литература; 2008. 132 с.

6. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1)

7. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R2) (проект)

8. Планирование и отчётность исследований по методам валидации.

Дополнение к руководству Eurachem по пригодности аналитических методов для конкретного применения

СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ!



**ФГБУ «НЦЭСМП»
Минздрава России**