



научный центр  
экспертизы средств  
медицинского применения

РегЛек – ЕАЭС



## Представление валидационных данных аналитических методик в материалах регистрационного досье. Анализ выявленных недочетов.

Кулешова Светлана Ивановна,

Начальник лаборатории антибиотиков ИЦЭКЛС ФГБУ «НЦЭСМП»  
Минздрава России

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



## Валидация аналитических методик

**1.ГФ 14 РФ 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 .**

**2.2. Верификация фармакопейных методик**

**3. Руководство по валидации аналитических методик проведения испытаний лекарственных средств, утверждено Решением Евразийской экономической комиссии от 17 июля 2018 г. №113.**

**4.ICH Q2 (R1) Валидация аналитических методик:текст и методология**



## Валидация аналитических методики

**5. Руководство EDQM Валидация/верификация аналитических  
методик.**

**6. WHO TRS 961**

**Надлежащая практика для лабораторий по микробиологическому  
контролю лекарственных средств**

**7. WHO TRS 957**

**WHO good practices for pharmaceutical quality control laboratories.**



## Валидация аналитических методик

**Аналитическая методика** - способ проведения анализа.

Должна подробно описывать все стадии аналитического теста. Образцы для испытания, стандартные образцы, реагенты и их подготовка, используемые приборы, способы расчета, формулы и т.д.

**Валидация аналитической методики** – экспериментальное доказательство того, что методика, предназначенная для контроля качества лекарственных средств, пригодна для решения предполагаемых задач.(2.1). Документированный процесс, с помощью которого демонстрируется пригодность аналитической процедуры (или метода) для её использования по назначению (7).

**Верификация** – процесс подтверждения подлинности данных и оценка возможности использования методики по назначению в реальных условиях её применения (2.2)



## Аналитические методики

• Тесты по идентификации (подлинность)

• (Сравнение свойств образца (спектры, хроматографическая подвижность, химические реакции.)

• Тесты по количественному определению примесей.

• Лимитные тесты по контролю примесей (предел содержания)

• (Тестирование примесей либо количественно, либо с использованием лимитного теста. В процессе валидации используют разные параметры)

• Количественные тесты на содержание действующего вещества в ЛС или других компонентах (консерванты) в ЛП.

•



# Валидационные характеристики

## Специфичность

1. *Идентификация*. Методика позволяет идентифицировать именно определяемое вещество; испытания на идентификацию должны обладать способностью различать между собой структурно близкородственные соединения (сравнения с известным стандартным образцом).
2. *Количественное определение и испытания на примеси*.
  - 2.1. **Количественное определение.** Хроматографические методы – подтверждение разделения компонентов (разрешение двух компонентов, которые элюируются близко друг к другу). Титрование – комбинация количественного определения и теста на примеси.
  - 2.2. **Примеси.** Наличие образцов примесей – отсутствие влияния примесей на результат количественного определения действующего вещества, определение примесей - доказательство разделения этих примесей друг от друга и (или) от других компонентов образца. Отсутствие образцов примесей - с равнение с валидированной методикой, использование образцов, подвергнувшихся искусственной деградации, исследования на чистоту пиков (диодно-матричного детектирования, масс-спектрометрии).



## Валидационные характеристики

**Предел обнаружения** – наименьшее количество анализируемого вещества в образце, которое можно детектировать. Необходимо указать предел обнаружения и метод его определения

1. Для методик с визуальной оценкой Предел обнаружения устанавливается путем анализа проб с известными концентрациями определяемого вещества и определения его минимального содержания, при котором оно достоверно обнаруживается.

(Определение примесей методом ТСХ)

2. Для методик с инструментальной оценкой анализа по соотношению сигнал/шум (методы, где наблюдается шум базовой линии. ) Устанавливают минимальное количество определяемого вещества, при котором отношение аналитического сигнала к уровню шумов равно 3. (метод ВЭЖХ)

Для методик 1 и 2 достаточно представление соответствующих хроматограмм

- Рассчитанный предел обнаружения или получен путем экстраполяции - независимое испытание количества образцов с содержанием определяемого вещества, соответствующим пределу обнаружения или близкому к нему значению.



## Валидационные характеристики

**Предел количественного определения** – количественный лимит методик для определения низкого содержания веществ в образце; для определения примесей и (или) продуктов деградации. Необходимо указать предел количественного определения и метод его определения.

Для методик с визуальной оценкой результатов устанавливают минимальное значение, при котором результат может быть получен визуально с требуемой правильностью и внутрилабораторной прецизионностью.

(Определение примесей методом ТСХ)

Для методик с инструментальной оценкой анализа по соотношению сигнал/шум (методы, где наблюдается шум базовой линии. ) Устанавливают минимальное количество определяемого вещества, при котором отношение аналитического сигнала к уровню шумов равно 10:1.

▪ Оценка предела количественного определения по стандартному отклонению сигнала и наклону градуировочной кривой.

***Представление данных*** - анализа достаточного числа проб с содержанием определяемого вещества, равным пределу количественного определения или близкому к нему значению.



## Валидационные характеристики

- **Линейность** – должна быть подтверждена в пределах всего диапазона применения аналитической методики, оценивают визуально по графику зависимости аналитического сигнала как функции от концентрации или количества определяемого вещества.
- Для подтверждения линейности должны быть определены и представлены коэффициент корреляции или коэффициент детерминации, свободный член линейной регрессии, тангенс угла наклона линии регрессии и остаточная сумма квадратов отклонений, а также приложен график со всеми экспериментальными данными
- Для установления линейности рекомендуется использовать как минимум 5 концентраций. Применение других подходов требует обоснования.

При отсутствии линейности данные испытаний следует подвергнуть математическому преобразованию



## Валидационные характеристики

- **Аналитическая область методики** – В пределах диапазона применения методика должна обеспечивать требуемую линейность, правильность и прецизионность.
- для количественного определения действующего вещества в ЛС - от номинала 80 % до 120 %;
- для однородности дозирования – от 70 % до 130 % (если не обоснован более широкий диапазон)
- для испытания на растворение – 20 % (абсолютных) от номинального диапазона применения.
- для определения примесей - от предела обнаружения примеси до 120 % от 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.
- **Количественное определение и чистота по одной методике со 100 % стандартом , линейная зависимость - от порог информирования для примеси до 120 %, указанного в спецификации для количественного определения.**



## Валидационные характеристики

**Правильность методики** Правильность должна быть установлена для всего диапазона применения аналитической методики.

- **Способы оценки правильности**

### **Субстанция**

- применение субстанции с известной степенью чистоты (стандартный образец);
- сравнение результатов анализа, полученных с использованием валидируемой методики, и результатов, полученных с помощью методики, правильность которой известна;
- На основе прецизионности, линейности и специфичности;

### **Лекарственный препарат**

- применение модельных смесей компонентов лекарственного препарата с добавлением известного количества определяемого вещества, возможно добавление заранее известного количества фармацевтической субстанции к лекарственному препарату;
- сравнение результатов анализа, полученных с использованием валидируемой методики, и результатов, полученных с помощью методики, правильность которой известна;
- На основе прецизионности, линейности и специфичности.

### **Примеси**

- пробы (фармацевтической субстанции и лекарственного препарата), в которые добавлено известное количество примесей;
- сравнение результатов с результатами, полученными с помощью независимой методики. Допускается использование аналитического сигнала действующего вещества (при отсутствии образцов примесей).



## Валидационные характеристики

- **Правильность методики**

- Правильность оценивается не менее чем для 9 определений 3 различных концентраций, охватывающих весь диапазон применения (то есть 3 концентрации и 3 повтора для каждой концентрации). Определения должны включать в себя все стадии методики.
- Правильность выражается величиной обнаруживаемости в процентах по результатам количественного определения вещества, добавленного в известном количестве в анализируемый образец, или разностью между полученным средним и истинным (опорным) значениями с учетом соответствующих доверительных интервалов.



# Валидационные характеристики

## **Прецизионность**

- Валидация методик количественного определения действующего вещества и количественного определения примесей предусматривает определение прецизионности.
- Прецизионность: повторяемость (сходимость), промежуточная прецизионность (внутрилабораторная) и воспроизводимость.
- Прецизионность следует устанавливать с использованием однородных образцов. В случае невозможности получения однородного образца допускается определение прецизионности с помощью искусственно приготовленных (модельных) смесей или раствора образца.
- **Повторяемость (сходимость)**
- Повторяемость определяется путем выполнения не менее 9 определений концентраций, входящих в диапазон применения аналитической методики (3 концентрации и 3 повтора для каждой концентрации), или не менее 6 определений концентрации для образцов со 100-процентным содержанием определяемого вещества.
- Промежуточная прецизионность (внутрилабораторная) - установить влияние случайных факторов на прецизионность аналитической методики. Типичными исследуемыми (вариабельными) факторами являются разные дни, аналитики, оборудование и т.д. Изучать указанные влияния по отдельности не требуется
- Воспроизводимость. (межлабораторная) – включение в регистрационное досье не требуется.
- Для каждого вида прецизионности необходимо указывать стандартное отклонение, относительное стандартное отклонение (коэффициент вариации) и доверительный интервал



## Валидационные характеристики

### Устойчивость (робастность).

Изучение устойчивости (робастности) необходимо осуществлять на стадии разработки, объем исследований зависит от рассматриваемой аналитической методики.

Общими вариациями параметров являются: стабильность растворов, используемых в аналитических методиках; время экстрагирования.

Параметрами вариации для жидкостной хроматографии: изменение pH подвижной фазы, изменение состава подвижной фазы, разные колонки (разные серии и поставщики); температура, скорость подвижной фазы (скорость потока).

•Параметрами вариации для газовой хроматографии: различные колонки (разные серии и поставщики), температура; скорость газа-носителя.

**Если результаты измерений зависят от изменений в условиях применения аналитической методики, необходимо строго контролировать соблюдение таких условий или оговорить меры предосторожности при проведении испытания.**



## Подтверждение пригодности системы

Оценка стабильности теста – неотъемлемая часть аналитических методик

- Требования к параметрам, характеризующих форму пика (эффективность хроматографической системы и фактор асимметрии).
- Требования к воспроизводимости (относительное стандартное отклонение) значений площади пиков или высоты пика.
- Требования к чувствительности при проведении испытания на примеси (минимально определяемая концентрация, фактически предел количественного определения примеси). Оценивается расчетом отношения сигнал/шум для раствора соответствующей концентрации.
- Оценка разделительной способности (разрешение между пиками или в случае не полностью разделенных пиков – соотношение  $r|v$ ).

Порог игнорирования (неучитываемый предел, уровень содержания вещества, при котором или при меньшем содержании пик не принимается во внимание)



# Ревалидация

**1.Изменение технологии получения**

**2. Изменение состава лекарственного средства**

**3.Внесение изменений в ранее утвержденную методику.**



## Отчет о валидации

-:

1. Полное описание методики, достаточное для воспроизведения и отражающее все условия, необходимые для выполнения анализа.
2. Оцениваемые характеристики
3. Все первичные результаты, которые вошли в статистическую обработку данных.
4. Результаты статистической обработки данных, полученных экспериментально при разработке или проверке валидируемой методики.
5. Иллюстративные материалы, копии хроматограмм (ВЭЖХ, ТСХ, ГЖХ), электрофореграмм, электронных и инфракрасных спектров, рисунки кривых титрования, калибровочные графики.
6. Заключение о пригодности валидируемой методики для включения в нормативный документ.



## **Типичные недочёты в материалах по валидации аналитических методик.**

- **Отсутствует полноценное описание методики с формулами расчета при их использовании.**
- **Методики, приведенные в проекте НД, не соответствуют методикам, приведенным в валидационных отчетах.**
- **Не приводится перечень используемых стандартных образцов, в том числе стандартов примесей с указанием их квалификации**
- **Отсутствуют рисунки типичных хроматограмм с указанием хроматографических условий (хроматографические колонки для ВЭЖХ, хроматографические пластинки для ТСХ). Для ЛП хроматограмма плацебо. Либо представляются некорректные хроматограммы, по которым невозможно оценить валидируемую методику.**
- **Не приводится линейность в аналитическом диапазоне.**
- **Отсутствует подтверждение сроков годности используемых растворов.**



## Верификация. Фармакопейные методики

1. **Субстанции** (АФС) – выполнение тестов пригодности системы, при этом методика должна быть детально описана. *специфичность (профиль примесей, в случае если профиль примесей отличается необходима валидация).*

2. **Лекарственный препарат** – оценить насколько фармакопейная методика применима для оценки качества препарата с учетом способа получения, качественного и количественного состава вспомогательных веществ.

### **Родственные примеси:**

- специфичность (отсутствие влияния вспомогательных веществ)
- порог регистрации примесей (как минимум предел количественного определения)



## Верификация. Фармакопейные методики

1

### Лекарственный препарат

#### Количественное определение:

- специфичность (отсутствие влияния вспомогательных веществ)
- точность (степень извлечения)
- Прецизионность (повторяемость) (мин 2 независимых определения с учетом целевой концентрации)
- линейность (три точки измерения с учетом целевой концентрации)



## Верификация. Фармакопейные методики

1. Метод для субстанции используется для готового лекарственного препарата.
- Влияние состава препарата на анализ, включая итерференцию со стороны вспомогательных веществ.

### **Родственные примеси:**

- специфичность (отсутствие влияния вспомогательных веществ)
- порог регистрации примесей ( предел обнаружения и предел количественного определения)
- Прецизионность в диапазоне.

### **Количественное определение:**

- специфичность (отсутствие влияния вспомогательных веществ)
- точность
- повторяемость
- линейность.

**Спасибо за внимание!**



научный центр  
экспертизы средств  
медицинского применения