

**ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**

---

**Валидация аналитических методик**

**ОФС.1.1.0012.15**

**Вводится впервые**

---

Валидация аналитической методики – это экспериментальное доказательство того, что методика пригодна для решения предполагаемых задач.

Настоящая общая фармакопейная статья регламентирует характеристики аналитических методик, определяемые с целью их валидации, и соответствующие критерии пригодности валидируемых методик, предназначенных для контроля качества лекарственных средств: фармацевтических субстанций и лекарственных препаратов.

Валидации подлежат методики количественного определения, в том числе методики определения примесей и методики определения предела содержания. Методики проверки подлинности подвергаются валидации при необходимости подтвердить их специфичность.

При валидации проводится оценка аналитической методики по перечисленным ниже характеристикам, выбираемым с учетом типовых рекомендаций, приведенных в таблице:

- специфичности (specificity);
- пределу обнаружения (detection limit);
- пределу количественного определения (quantitation limit);
- аналитической области (range);
- линейности (linearity);
- правильности (trueness);

- прецизионности (precision);
- устойчивости (robustness).

Таблица 1 – Характеристики методик, определяемые при валидации

Наименование характеристики	Основные типы методик				
	Испытание на подлинность	Посторонние примеси		Количественное определение	
		Количественные методики	Предел содержания	Основного действующего вещества, нормируемых компонентов	Действующего вещества в тесте «Растворение»
Специфичность <sup>**)</sup>	Да	Да	Да	Да	Да
Предел обнаружения	Нет	Нет	Да	Нет	Нет
Предел количественного определения	Нет	Да	Нет	Нет	Нет
Аналитическая область	Нет	Да	Нет	Да	Да
Линейность	Нет	Да	Нет	Да	Да
Правильность	Нет	Да	*	Да	Да
Прецизионность: – повторяемость (сходимость) – промежуточная (внутрилабораторная) прецизионность	Нет	Да	Нет	Да	Да
	Нет	Да	Нет	Да	Нет
Устойчивость	Нет	*	*	*	*

<sup>\*)</sup> может определяться при необходимости;

<sup>\*\*)</sup> отсутствие специфичности одной аналитической методики может быть компенсировано использованием другой аналитической методики.

Ревалидацию (повторную валидацию) методик проводят при изменении:

- технологии получения объекта анализа;
- состава лекарственного средства (объекта анализа);
- ранее утвержденной методики анализа.

## 1. СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Специфичность – это способность аналитической методики однозначно оценивать определяемое вещество в присутствии сопутствующих компонентов.

Доказательство специфичности валидируемой методики обычно основывается на рассмотрении полученных с ее использованием данных анализа модельных смесей известного состава.

Специфичность валидируемой методики может быть доказана также соответствующей статистической обработкой результатов анализов реальных объектов, выполненных с ее использованием и, параллельно, с использованием другой, заведомо специфичной, методики (методики, специфичность которой доказана).

### ***1.1 Для методик испытаний на подлинность***

Валидируемая методика (или совокупность методик) должна обеспечивать достоверную информацию о присутствии данного действующего вещества в субстанции или лекарственной форме при наличии в ее составе предусмотренных рецептурой компонентов, что подлежит экспериментальному подтверждению.

Подлинность действующего вещества в фармацевтической субстанции или лекарственном препарате устанавливают в сравнении со стандартным образцом или по физико-химическим или химическим свойствам, не характерным для других компонентов.

### ***1.2 Для методик количественного определения и испытания на примеси***

Для валидируемой методики количественного определения и испытаний на примеси применяют одинаковые подходы – должна быть оценена ее специфичность в отношении определяемого вещества, т. е. должно быть экспериментально подтверждено, что присутствие сопутствующих компонентов не влияет непредусмотренным образом на результат анализа.

Допускается оценка специфичности валидируемой методики как путем анализа модельных смесей известного состава, содержащих определяемое вещество, так и путем сравнения результатов анализов реальных объектов,

полученных одновременно с использованием валидируемой и другой, заведомо специфичной методики. Результаты соответствующих экспериментов должны быть статистически обработаны.

Недостаток специфичности испытания может быть компенсирован другим (другими) дополнительным испытанием.

При валидации методик, если это целесообразно, могут использоваться образцы лекарственных средств, подвергнутые, с целью накопления в них примесей, воздействию экстремальных условий (света, температуры, влажности) или химически модифицированные любым подходящим способом.

Для хроматографических методик показывают разрешение между двумя наиболее близко элюирующимися веществами при соответствующих концентрациях.

## **2. ПРЕДЕЛ ОБНАРУЖЕНИЯ**

Предел обнаружения – это наименьшее количество (концентрация) определяемого вещества в образце, которое может быть обнаружено (или приближенно оценено) с использованием валидируемой методики.

Предел обнаружения в случаях, указанных в таблице, обычно выражается как концентрация определяемого вещества (в % относительных или долях на миллион – ppm).

В зависимости от типа методики (визуальная или инструментальная) используют разные способы определения предела обнаружения.

### ***2.1 Для методик с визуальной оценкой результата анализа***

Проводят испытания образцов с различными известными количествами (концентрациями) определяемого вещества и устанавливают минимальное значение, при котором результат анализа может быть оценен визуально. Это значение является оценкой предела обнаружения.

### ***2.2 Для методик с инструментальной оценкой результата анализа***

#### ***2.2.1 По соотношению сигнал/шум***

Этот подход применим к методам, для которых наблюдается шум базовой линии. Сравнивают величины сигналов, полученных для контрольного опыта и для образцов с низкими концентрациями анализируемого вещества. Устанавливают минимальное количество (концентрацию) определяемого вещества в образце, при котором величина отношения аналитического сигнала к уровню шумов равна 3.

Найденная величина является оценкой предела обнаружения.

*2.2.2 По величине стандартного отклонения сигнала и угловому коэффициенту калибровочного графика*

Предел обнаружения (ПО) находят по уравнению:

$$\text{ПО} = 3,3 \cdot S/b,$$

где  $S$  – стандартное отклонение аналитического сигнала;

$b$  – коэффициент чувствительности, представляющий собой отношение аналитического сигнала к определяемой величине (тангенс угла наклона калибровочной кривой).

При наличии экспериментальных данных в широком диапазоне измеряемой величины  $S$  и  $b$  могут быть оценены методом наименьших квадратов.

Для линейного калибровочного графика значение  $S$  принимают равным стандартному отклонению  $S_a$  свободного члена уравнения этого графика. Полученное значение предела обнаружения при необходимости может быть подтверждено прямым экспериментом при количествах (концентрациях) определяемого вещества, близких к найденному значению предела обнаружения.

Как правило, если имеются данные о пригодности методики для надежного определения вещества в концентрациях, лежащих как выше, так и ниже нормы его содержания, установленной спецификацией, определять реальный предел обнаружения для такой методики не требуется.

### **3. ПРЕДЕЛ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ**

Предел количественного определения – это наименьшее количество (концентрация) вещества в образце, которое может быть количественно оценено с использованием валидируемой методики с требуемой правильностью и внутрилабораторной (промежуточной) прецизионностью.

Предел количественного определения является необходимой валидационной характеристикой методик, используемых для оценки малых количеств (концентраций) веществ в образце и, в частности, для оценки содержания примесей.

В зависимости от типа методики используют следующие способы нахождения предела количественного определения.

### ***3.1 Для методик с визуальной оценкой результата анализа***

Проводят испытания образцов с различными известными количествами (концентрациями) анализируемого вещества и устанавливают минимальное значение, при котором результат анализа может быть получен визуально с требуемой правильностью и внутрилабораторной (промежуточной) прецизионностью.

### ***3.2 Для методик с инструментальной оценкой результата анализа***

#### ***3.2.1 По соотношению сигнал/шум***

Устанавливают минимальную концентрацию определяемого вещества в образце, при которой величина отношения аналитического сигнала к уровню шума составляет около 10:1.

#### ***3.2.2 По величине стандартного отклонения сигнала и угловому коэффициенту калибровочного графика***

Предел количественного определения (ПКО) рассчитывают по уравнению:

$$\text{ПКО} = 10 \cdot S/b,$$

где  $S$  – стандартное отклонение аналитического сигнала;

$b$  – коэффициент чувствительности, представляющий собой отношение аналитического сигнала к определяемой величине.

При наличии экспериментальных данных в широком диапазоне измеряемой величины  $S$  и  $b$  могут быть оценены методом наименьших квадратов.

Для линейного калибровочного графика значение  $S$  принимают равным стандартному отклонению  $S_a$  свободного члена уравнения этого графика. Полученное значение предела количественного определения при необходимости может быть подтверждено прямым экспериментом при количествах (концентрациях) определяемого вещества, близких к найденному значению предела количественного определения.

Если имеются данные о способности методики надежно определять анализируемое вещество в концентрации выше и ниже установленной в спецификации нормы его содержания, определять реальное значение предела количественного определения для такой методики, как правило, не требуется.

#### **4. АНАЛИТИЧЕСКАЯ ОБЛАСТЬ МЕТОДИКИ**

Аналитическая область методики – это интервал между верхним и нижним значением аналитических характеристик определяемого компонента в объекте анализа (его количества, концентрации, активности и т. п.). В этом интервале результаты, получаемые с использованием валидируемой методики, должны иметь приемлемый уровень правильности и внутрилабораторной (промежуточной) прецизионности.

К величине аналитической области методик предъявляются следующие требования:

– методики количественного определения должны быть применимы в интервале от 80 до 120 % от номинального значения определяемой аналитической характеристики;

– методики оценки однородности дозирования должны быть применимы в интервале от 70 до 130 % от номинальной дозы;

– методики количественного определения, используемые при проведении теста «Растворение», обычно должны быть применимы в

пределах от 50 до 120 % от ожидаемой концентрации действующего вещества в среде растворения;

– методики испытаний на чистоту должны быть применимы в интервале от «Предела количественного определения» или «Предела обнаружения» до 120 % от допустимого содержания определяемой примеси.

Аналитическая область методики может быть установлена по диапазону экспериментальных данных, удовлетворяющих линейной модели.

## 5. ЛИНЕЙНОСТЬ

Линейность методики – это наличие линейной зависимости аналитического сигнала от концентрации или количества определяемого вещества в анализируемой пробе в пределах аналитической области методики.

При валидации методики ее линейность в аналитической области проверяют экспериментально измерением аналитических сигналов для не менее чем 5 проб с различными количествами или концентрациями определяемого вещества. Экспериментальные данные обрабатывают методом наименьших квадратов с использованием линейной модели:

$$y = b \cdot x + a,$$

где  $x$  – количество или концентрация определяемого вещества;

$y$  – величина отклика;

$b$  – угловой коэффициент;

$a$  – свободный член (ОФС «Статистическая обработка результатов химического эксперимента»).

Должны быть рассчитаны и представлены величины  $b$ ,  $a$  и коэффициент корреляции  $r$ . В большинстве случаев используют линейные зависимости, отвечающие условию  $|r| \geq 0,99$ , и только при анализе следовых количеств рассматривают линейные зависимости, для которых  $|r| \geq 0,9$ .

В отдельных случаях возможность линейной аппроксимации экспериментальных данных обеспечивается лишь после их математического преобразования (например, логарифмирования).

Для некоторых методик анализа, в основу которых в принципе не может быть положена линейная зависимость между экспериментальными данными, определение концентрации или количества вещества проводят с использованием нелинейных калибровочных графиков. При этом график зависимости аналитического сигнала от количества или концентрации определяемого вещества может быть аппроксимирован подходящей нелинейной функцией с использованием метода наименьших квадратов, что выполнимо при наличии соответствующего валидированного программного обеспечения.

## **6. ПРАВИЛЬНОСТЬ**

Правильность методики характеризуется отклонением среднего результата определений, выполненных с ее использованием, от значения, принимаемого за истинное.

Валидируемая методика признается правильной, если значения, принимаемые за истинные, лежат внутри доверительных интервалов соответствующих средних результатов анализов, полученных экспериментально по данной методике.

Для оценки правильности методик количественного определения применимы следующие подходы:

а) анализ с использованием валидируемой методики стандартных образцов или модельных смесей с известным содержанием (концентрацией) определяемого вещества;

б) сравнение результатов, полученных с использованием валидируемой методики и образцовой методики, правильность которой ранее установлена;

в) рассмотрение результатов изучения линейности валидируемой методики: если свободный член в уравнении, приведенном в разделе 5,

статистически достоверно не отличается от нуля, то использование такой методики дает результаты, свободные от систематической ошибки.

Для подходов «а» и «б» возможно представление полученных данных в виде уравнения линейной зависимости (регрессии) между экспериментально найденными и истинными величинами. Для этого уравнения проверяются гипотезы о равенстве единице тангенса угла наклона  $b$  и о равенстве нулю свободного члена  $a$ . Как правило, если эти гипотезы признаются верными при степени надежности, равной 0,05, то использование валидируемой методики дает правильные, т. е. свободные от систематической ошибки, результаты.

## **7. ПРЕЦИЗИОННОСТЬ**

Прецизионность методики характеризуется рассеянием результатов, получаемых с ее использованием, относительно величины среднего результата. Мерой такого рассеяния является величина стандартного отклонения результата отдельного определения, полученная для выборки достаточно большого объема.

Прецизионность оценивается для любой методики количественного определения по результатам не менее трех определений для каждого из трех уровней определяемых величин (нижнего, среднего и верхнего), лежащих в пределах аналитической области методики. Повторяемость также может оцениваться для любой методики количественного определения по результатам не менее шести определений для образцов с содержанием определяемого вещества, близким к номинальному. Во многих случаях оценка прецизионности может быть проведена по результатам обработки экспериментальных данных методом наименьших квадратов, как указано в ОФС «Статистическая обработка результатов химического эксперимента».

Прецизионность должна исследоваться на однородных образцах и может оцениваться в трех вариантах:

- как повторяемость (сходимость);
- как внутрилабораторная (промежуточная) прецизионность;

– как межлабораторная прецизионность (воспроизводимость).

Результаты оценки методики анализа по каждому из вариантов прецизионности обычно характеризуются соответствующим значением величины стандартного отклонения результата отдельного определения.

Обычно при разработке оригинальной методики определяется повторяемость (сходимость) результатов, получаемых с ее использованием. При необходимости включения разработанной методики в нормативную документацию дополнительно определяется ее внутрिलाбораторная (промежуточная) прецизионность. Межлабораторная прецизионность (воспроизводимость) методики оценивается при предполагаемом ее включении в проект общей фармакопейной статьи, фармакопейной статьи или в нормативную документацию на фармакопейные стандартные образцы.

### ***7.1 Повторяемость (сходимость)***

Повторяемость аналитической методики оценивают по независимым результатам, полученным в одинаковых регламентированных условиях в одной лаборатории (один и тот же исполнитель, одно и то же оборудование, один и тот же набор реактивов) в пределах короткого промежутка времени.

### ***7.2 Внутрिलाбораторная (промежуточная) прецизионность***

Внутрिलाбораторная (промежуточная) прецизионность валидируемой методики оценивается в условиях работы одной лаборатории (разные дни, разные исполнители, разное оборудование и т. д.).

### ***7.3 Межлабораторная прецизионность (воспроизводимость)***

Межлабораторная прецизионность (воспроизводимость) валидируемой методики оценивается при проведении испытаний в разных лабораториях.

## **8. УСТОЙЧИВОСТЬ**

Устойчивость валидируемой методики – это способность сохранять найденные для нее в оптимальных (номинальных) условиях характеристики, приведенные в таблице, при вероятных небольших отклонениях от этих условий проведения анализа.

Устойчивость методики не следует определять по отношению к легко контролируемым условиям проведения анализа. Это резко сокращает необходимость в специальном изучении устойчивости.

Устойчивость должна изучаться только в тех случаях, когда валидируемая методика основана на использовании особо чувствительных к внешним условиям методов анализа, таких как различные виды хроматографии и функционального анализа. При необходимости оценка устойчивости методики проводится на стадии ее разработки. Если вероятна невысокая устойчивость методики, проверка ее пригодности осуществляется в обязательном порядке непосредственно в процессе практического использования.

### **Проверка пригодности аналитической системы**

Проверка пригодности аналитической системы – это проверка выполнения основных требований, предъявляемых к ней. Система, пригодность которой проверяется, представляет собой совокупность конкретных приборов, реактивов, стандартов и анализируемых образцов. Требования к такой системе обычно конкретизированы в общей фармакопейной статье на соответствующий аналитический метод. Таким образом, проверка пригодности аналитической системы становится процедурой, включаемой в валидируемую методику.

### **Представление результатов валидации**

Протокол валидации аналитической методики должен содержать:

- ее полное описание, достаточное для воспроизведения и отражающее все условия, необходимые для выполнения анализа;
- оцениваемые характеристики;
- все первичные результаты, которые вошли в статистическую обработку данных;
- результаты статистической обработки данных, полученных экспериментально при разработке или проверке валидируемой методики;

– иллюстративные материалы, такие как копии хроматограмм, полученных методами высокоэффективной жидкостной хроматографии или газовой хроматографии; электрофореграмм, электронных и инфракрасных спектров; фотографии или рисунки хроматограмм, полученных методами тонкослойной или бумажной хроматографии; рисунки кривых титрования, калибровочные графики;

– заключение о пригодности валидируемой методики для включения в нормативный документ.

Материалы валидации отдельных аналитических методик целесообразно оформлять в виде объединенного отчета о валидации.