**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**

|  |
| --- |
|  |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Валидация аналитических методик** |  | **ОФС.1.1.0012** |
|  |  | **Взамен ОФС.1.1.0012.15** |

|  |
| --- |
|  |

Валидация аналитической методики – это экспериментальное доказательство того, что методика, предназначенная для контроля качества лекарственных средств, пригодна для решения предполагаемых задач.

Аналитические методики, приводимые в фармакопейной статье, являются валидированными. Однако, правильность их использования в условиях конкретной лаборатории должна быть подтверждена. Для этих целей, а также для оценки применимости методики испытания для контроля качества лекарственных средств применяют процедуру верификации.

**Термины и определения**

*Аналитическая методика* **–** методика проведения испытаний лекарственных средств, включающая подробное описание последовательности действий, необходимых для выполнения аналитического испытания, в том числе описание подготовки испытуемых образцов, стандартных образцов, реактивов, использование оборудования, построения градуировочной кривой, используемых расчётных формул и т.д.

*Верификация* (оценка применимости) *методики* – экспериментальное доказательство того, что методика пригодна для достижения тех целей, для которых она предназначена, и может быть корректно воспроизведена в условиях конкретной лаборатории.

*Воспроизводимость* – свойство, характеризующеё прецизионность в межлабораторных испытаниях.

*Диапазон применения* (аналитическая область) – интервал между наибольшей и наименьшей концентрациями (количеством) определяемого вещества в образце (включая эти концентрации), для которого показано, что аналитическая методика имеет приемлемый уровень прецизионности, правильности и линейности.

*Линейность* – прямо пропорциональная зависимость аналитического сигнала от концентрации (количества) определяемого вещества в анализируемой пробе в пределах диапазона применения (аналитической области) методики.

*Открываемость –* соотношение между полученным средним и истинным значениями с учётом соответствующих доверительных интервалов.

*Повторяемость* (прецизионность внутри методики) – прецизионность методики при выполнении повторных испытаний 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.

*Правильность* – близость полученного значения к истинному (опорному), которая выражается величиной открываемости. Характеризует систематическую ошибку.

*Предел количественного определения* – наименьшее количество (концентрация) вещества в образце, которое может быть количественно определено с требуемой правильностью и внутрилабораторной (промежуточной) прецизионностью.

*Предел обнаружения* – наименьшее количество (концентрация) определяемого вещества в образце, которое может быть обнаружено, но необязательно точно количественно определено.

*Прецизионность* – выражение близости (степени разброса) результатов (значений) между сериями измерений, взятых из одной и той же однородной пробы, в предписанных методикой условиях. Мерой прецизионности является величина стандартного отклонения результата отдельного определения, полученная для выборки достаточно большого объёма.

*Промежуточная (внутрилабораторная) прецизионность* – влияние вариаций внутри лаборатории (разные дни, разные аналитики, разное оборудование, разные серии (партии) реактивов и т.д.) на результаты испытаний идентичных образцов, отобранных из одной и той же серии.

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

*Устойчивость* (*робастность*) – способность аналитической методики быть устойчивой к влиянию небольших задаваемых изменений в условиях проведения испытания, которая указывает на её надежность при обычном (стандартном использовании).

**Типы аналитических методик, подлежащих валидации**

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 учётом типовых рекомендаций, приведённых в таблице:

- специфичности (specificity);

- пределу обнаружения (detection limit);

- пределу количественного определения (quantitation limit);

- линейности (linearity);

- правильности (trueness);

- прецизионности (precision);

- диапазону применения (аналитической области) (range);

-устойчивости (робастности) (robustness).

Таблица – Характеристики методик, определяемые при валидации

|  |  |
| --- | --- |
| *Наименование характеристики* | *Основные типы методик* |
| *Испытание на подлинность* | *Примеси* | *Количественные определения* |
| *Количественные методики* | *Предел содержания* | *Основного действующего вещества, нормируемых компонентов* | *Действующего вещества в тесте «Растворение»* |
| Специфичность\*\*) | Да | Да | Да | Да | Да |
| Предел обнаружения  | 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 | НетНет | ДаДа | НетНет | ДаДа | ДаНет |
| Устойчивость (робастность) | Нет | \* | \* | \* | \* |
| \*) может определяться при необходимости;\*\*) отсутствие специфичности одной аналитической методики может быть компенсировано использованием другой аналитической методики;\*\*\*) может потребоваться в некоторых случаях (например, когда предел обнаружения и нормируемый предел содержания определяемой примеси близки). |

Ревалидацию (повторную валидацию) методик проводят при:

- изменении технологии получения объекта анализа;

- изменении состава лекарственного средства (объекта анализа);

- изменении ранее утверждённой методики анализа.

***1. Специфичность***

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

Специфичность валидируемой методики может быть доказана также соответствующей статистической обработкой результатов анализов реальных объектов, выполненных с её 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 её 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.

Испытания на подлинность заключаются, как правило, в сравнении свойств (например, спектральных характеристик, хроматографического поведения, химической активности и т.д.) испытуемого и стандартного образцов.

Удовлетворительные испытания на подлинность должны обладать способностью различать между собой структурно близкородственные соединения.

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

Для валидируемой методики количественного определения должна быть оценена её специфичность в отношении определяемого вещества, то есть должно быть экспериментально подтверждено, что присутствие сопутствующих компонентов не влияет непредусмотренным образом на результат анализа.

Для валидируемой методики испытаний на примеси должно быть подтверждение того, что методика позволяет правильно распознать примеси в образце, например испытание на родственные соединения, тяжёлые металлы, содержание остаточных растворителей и т.д.

Допускается оценка специфичности валидируемой методики как путём 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 в случаях, указанных в таблице, обычно выражается как концентрация определяемого вещества (в % 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. Для оценки предела обнаружения приемлемой считается величина отношения «сигнал/шум» от 3:1 до 2:1.

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

Предел обнаружения (ПО) находят по формуле (1):

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | $$ПО=3,3∙\frac{S}{b},$$ | (1) |

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 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 *Sa* 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 является необходимой валидационной характеристикой методик, используемых для оценки малых количеств (концентраций) веществ в образце и, в частности, для оценки содержания примесей и (или) продуктов деградации.

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***

Данный подход применим только к методам измерений, при которых наблюдается шум базовой линии.

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) находят по формуле (2):

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | $$ПКО=10∙\frac{S}{b},$$ | (2) |

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 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 *Sa* 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. Диапазон применения*** *(****аналитическая область) методики***

В пределах диапазона применения 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, если для лекарственного препарата не обоснован более широкий диапазон в зависимости от лекарственной формы (например, дозированные ингаляторы);

- методики количественного определения, используемые при проведении испытания по показателю «Растворение», обычно должны быть применимы в пределах ±20 % (абсолютных) от номинального диапазона применения. Например, если спецификации препарата с модифицированным высвобождением охватывают область от 20 % за первый час до 90 % от заявленного содержания за 24 часа, валидированный диапазон применения должен быть от 0 до 110 % от заявленного содержания;

- методики испытаний на примеси должны быть применимы в интервале от «Предела обнаружения» до 120 % от нормируемого содержания.

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

***5. Линейность***

При валидации методики её линейность в диапазоне применения (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 по формуле (3):

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | $$y=b∙x+a,$$ | (3) |

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | $$x$$ | − | количество или концентрация определяемого вещества;  |
|  | $$y$$ | – | величина отклика; |
|  | *b* | ­– | угловой коэффициент линейной зависимости; |
|  | *a* | – | свободный член (ОФС «Статистическая обработка результатов физических, физико-химических и химических испытаний»). |

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

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.

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 даёт правильные, то есть свободные от систематической ошибки, результаты.

Правильность оценивается не менее чем для 9 определений 3 различных концентраций, охватывающих весь диапазон применения (то есть 3 концентрации и 3 повтора каждой концентрации). Определения должны включать в себя все стадии методики.

Правильность выражается величиной открываемости в процентах по результатам количественного определения вещества, добавленного в известном количестве в анализируемый образец, или разностью между полученным средним и истинным значениями с учетом соответствующих доверительных интервалов.

Заключение о правильности можно сделать после установления прецизионности, линейности и специфичности.

***7. Прецизионность***

Прецизионность оценивается для любой методики количественного определения по результатам не менее 3 определений для каждого из 3 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 6 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 физических, физико-химических и химических испытаний».

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

- как повторяемость (сходимость);

- как внутрилабораторная (промежуточная) прецизионность;

- как межлабораторная прецизионность (воспроизводимость).

Для каждого вида прецизионности необходимо указывать стандартное отклонение, относительное стандартное отклонение (коэффициент вариации) и доверительный интервал.

Обычно при разработке оригинальной методики определяется повторяемость (сходимость) результатов, получаемых с её использованием. При необходимости включения разработанной методики в нормативную документацию дополнительно определяется её внутрилабораторная (промежуточная) прецизионность. Межлабораторная прецизионность (воспроизводимость) методики оценивается при предполагаемом её включении в проект ОФС, ФС.

***7.1. Повторяемость (сходимость)***

Повторяемость определяется путём 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 % содержанием определяемого вещества.

***7.2. Внутрилабораторная (промежуточная) прецизионность***

Степень установления промежуточной прецизионности зависит от условий использования аналитической методики. Необходимо установить влияние случайных факторов на прецизионность аналитической методики. Типичными исследуемыми (вариабельными) факторами являются разные дни, исполнители, оборудование и т.д.; изучать указанные влияния по отдельности не требуется. При изучении влияния различных факторов предпочтительно использовать планирование эксперимента.

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

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

***8. Устойчивость (робастность)***

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 её разработки. Если вероятна невысокая устойчивость методики, проверка её пригодности осуществляется в обязательном порядке непосредственно в процессе практического использования.

В целях обеспечения поддержания валидности аналитической методики при её использовании одним из последствий изучения устойчивости (робастности) должно стать установление серий параметров пригодности системы.

Общими вариациями параметров являются:

- стабильность растворов, используемых в аналитических методиках;

- время экстрагирования.

Параметрами вариации для жидкостной хроматографии являются:

- изменение рН подвижной фазы;

- изменение состава подвижной фазы;

- разные хроматографические колонки (разные серии и поставщики);

- температура;

- скорость подвижной фазы.

Параметрами вариации для газовой хроматографии являются:

- разные хроматографические колонки (разные серии и поставщики);

- температура;

- скорость газа-носителя.

**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:

- полное описание методики, 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 ИК-спектров; фотографии или рисунки хроматограмм, полученных методами тонкослойной или бумажной хроматографии; рисунки кривых титрования, калибровочные графики;

- заключение о пригодности валидируемой методики для включения в нормативную документацию.