Для определения Z-показателя рекомендуется строить график lg D-показателя относительно температуры стерилизации. При определении Z-показателя опытным путем измерения проводятся не менее чем на 3 температурах (рис. 9).

D- и Z-показатели используются для вычисления показателей эффективности стерилизации: F_0 — показатель эффективности паровой стерилизации, F_H — показатель эффективности воздушной стерилизации.

В Европейской фармакопее F_0 определяется как показатель летальности паровой стерилизации для продукта в первичной упаковке, выраженный в минутах для температуры 121°С, эквивалентный тест-микроорганизму (биологическому индикатору) со значением Z-показателя, равному 10. F_0 вычисляется по одной из формул:

$F_0 = D_{121}(\lg N_0 - \lg N) = D_{121} \lg IF$ (Европейская фармакопея),

где D_{121} — D-показатель тест-микроорганизма (обычно B.stearothermophilus),

N_0 — начальная бионагрузка (количество КОЕ),

N — количество КОЕ после стерилизации,

IF — фактор инактивации.

Или метод Паташника, Patashnik method:

$$F_H = \Delta t\, 10^{(T - T_b)/z},$$

где Δt — время стерилизационного цикла,

T_b — базовая температура стерилизации (для паровой — 121°С, для воздушной — 170°С).

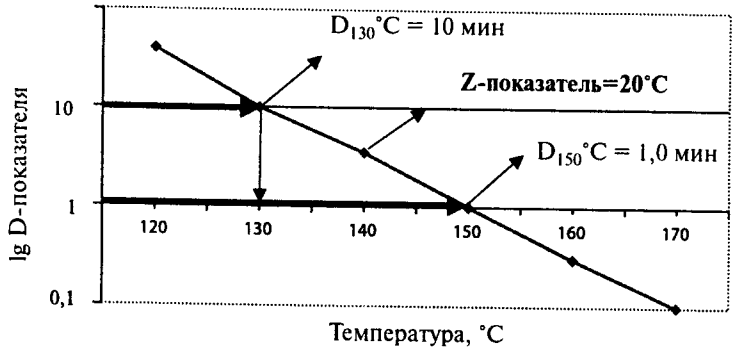

Рис. 9. График для оценки Z-показателя (константы скорости инактивации)

Данный подход позволяет определить общую летальность процессов стерилизации при наборе стерилизатором заданной фармакопеей температуры и во время охлаждения, учитывая, что при температуре 100°С также происходит инактивация отдельных микроорганизмов.

Так как в зависимости от типа термической стерилизации используется разное оборудование — подходы, параметры процесса и критерии приемлемости валидации будут несколько отличаться.

Подходы к валидации воздушной стерилизации

Как правило, воздушная стерилизация применяется в фармацевтической промышленности в 2 вариантах: стерилизация серий готовой продукции в воздушных стерилизаторах (по партиям) и непрерывная стерилизация продукции в туннеле.

На стадии квалификации дизайна учитываются выбранный вариант воздушной стерилизации, обеспечение разницы давления (если требуется), требуемый объем стерилизатора, тип стерилизуемого материала и подготовка к стерилизации. Квалификация установки должна подтвердить, что оборудование имеет все необходимые соединения и измерительные приборы. Измерительные приборы должны быть прокалиброваны: температурные датчики и контроллеры; манометры, анемометры и др. На этапе квалификации функционирования должны быть подтверждены основные критические параметры работы оборудования. Квалификация эксплуатации (PQ/PV) должна содержать проверку как минимум следующих показателей:

Стерилизаторы	Стерилизационные туннели
Система подачи воздуха и его фильтрации	Относительное давление воздуха на входе и выходе туннеля
Системы выхода воздуха и его фильтрации	Фильтрация охлаждающего и отработанного воздуха
Скорость вентиляторов и внутренние потоки воздуха	

ВАЛИДАЦИЯ АНАЛИТИЧЕСКИХ МЕТОДИК

Цель валидации аналитических методик — демонстрация их пригодности для решения предполагаемых задач, т.е. установления измеряемых и оцениваемых показателей качества лекарственных средств, другими словами, пригодности для проведения контроля качества.

Обязательность проведения валидации аналитических методик установлена п. 7.2 ОСТ 42-510-98.

Следует отметить, что валидация аналитических методик является не только частью правил GMP, но связана и с другими разделами системы обеспечения качества фармацевтической продукции (создание фармакопей, функционирование аналитических лабораторий и т.д.).

Основное отличие от других видов валидации заключается в использовании иных подходов — определении конкретных характеристик методики, а не в учете результатов испытаний по принципу «да-нет».

В литературе, посвященной валидации аналитических методик, на настоящий момент так же, как и в других областях валидации, отсутствует единство понятий и терминов. Поэтому для однозначности понимания целей и задач валидации необходимо четко определить различие понятий «контроль» и «испытание», «метод» и «методика».

Контроль — это процесс определения соответствия значений параметра изделия установленным требованиям или нормам, другими словами, поиск дефектов. Испытание — экспериментальное определение количественных и/или качественных характеристик свойств объекта испытаний. Следует отметить, что измерение представляет собой часть испытания.

Сравнение содержания терминов «испытание» и «контроль» приведено в табл. 9.

Таким образом, испытания представляют собой часть контроля, а измерения — часть испытаний.

Такое же соотношение «целого» и «части» справедливо и для терминов «метод» и «методика».

Так, в Государственной фармакопее XI издания имеются общие статьи на методы анализа, метрологически аттестованные, включающие раздел «методика определения». В метрологической практике используется термин «методика выполнения измерений», под которой понимается установленная совокупность операций и правил, выполнение которых обеспечивает получение результатов измерений с гарантированной точностью в соответствии с принятым методом.

Следовательно, в зависимости от задачи можно говорить о метрологической аттестации метода (в случае ее отсутствия в фармакопее) и валидации методики выполнения измерений для конкретного лекарственного средства.

Таблица 9

Сравнение терминов «испытание» и «контроль»

	Контроль	Испытание
Цель	Нахождение истинного значения параметра или характеристики	Оценка соответствия
Результат	Количественные/качественные характеристики объекта	Получение уверенности в отсутствии дефекта
Диапазон	Широкий	Пределы небольшого числа возможных состояний
Средства измерения	Параметры широкие	Для измерения параметров в узких пределах
Характеристика качества процедуры	Точность	Достоверность

В руководстве ассоциации Eurachem по подтверждению пригодности аналитических методик[34] валидация методики рассматривается прежде всего как:

«1. Процесс определения рабочих параметров и ограничений применения методики, выявления условий, которые могут повлиять на эти параметры, и степени этого влияния. Какие определяемые вещества можно определять этой методикой в каких средах в присутствии каких других веществ? Какие уровни прецизионности и правильности могут быть достигнуты в данных условиях?

2. Процесс подтверждения, что методика подходит для поставленной цели, т.е. для решения определенной аналитической задачи».

Существует целый набор параметров, с помощью которых проводят оценку методики.

При валидации аналитических методик в фармации в основном пользуются такими параметрами, как «Правильность», «Точность/прецизионность», «Сходимость», «Внутрилабораторная точность», «Специфичность», «Предел обнаружения», «Предел количественного определения», «Линейность», «Диапазон применения»,

[34] Eurachem guide «The fitness for purpose of analytical methods».

определения которых приведены в документах Международной конференции по гармонизации (далее ICH), Всемирной организации здравоохранения, монографии Американской фармакопеи. Определения этих терминов приведены в табл. 10.

Как уже упоминалось ранее, определения русскоязычных терминов пока еще не устоялись, поэтому для исключения двойственности в понимании терминов, которые возникают при переводе, нами использованы также стандарты ГОСТ Р ИСО 5725 «Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений», посвященные вопросам оценки методик выполнения измерений.

Валидация аналитических методик проводится в следующих случаях:

1) при разработке новых методов и методик на предприятии, не включенных в Государственную фармакопею;

2) при внедрении на предприятии методик, описанных в фармакопеях.

При внесении изменения в методы и методики проводится повторная валидация.

Первый шаг по подготовке методики к валидации — принятие решения о необходимости проведения валидации методики и составления перечня характеристик, наличие которых нужно подтвердить.

Рекомендации по выбору этих характеристик приведены в табл. 10, составленной по следующим документам: ICH Q2B Validation of analytical procedures: methodology; WHO Expert Committee on specifications for pharmaceutical preparations; Validation of analytical procedures used in the examination of pharmaceuticals; USA FDA. Guidance for industry. Bionanalytical Method Validation; USA FDA/CDER. Review Guidance. Validation of chromatographic methods. 1994.

На втором этапе подготовительных работ по проведению валидации устанавливаются критерии приемлемости, при достижении которых наличие у методики выбранной характеристики считается доказанным, и требований к проведению валидации (т.е. постановки экспериментов).

В качестве критериев приемлемости используются: % от ожидаемого значения, стандартное (среднеквадратичное) отклонение (standard deviation), коэффициент вариантности (relative standard deviation = относительное стандартное отклонение в %), коэффициент регрессии, обычно при доверительной вероятности P > 95%, а в некоторых случаях и при P > 99%.

Объем лабораторных работ по проведению валидации определяется документами, которыми руководствуется предприятие (руководства FDA, руководства Eurochem и др.), поскольку в разных руководствах приводятся разные рекомендации по количеству определений.

Работы по валидации аналитических методик, как правило, планируются на стадии разработки и доклинических исследований, должны начинаться на 1-й фазе клинических исследований и полностью должны быть завершены на 3-й стадии исследований, т.е. перед формированием регистрационного досье. Принципиальная схема разработки аналитических методик представлена на рис. 10.

Рис. 10. Принципиальная схема разработки аналитической методики

Таблица 10

Определения терминов, используемых при валидации аналитических методик

Наименование параметра	Руководство ICH	Руководство Eurachem	Руководство ВОЗ
1	2	3	4
Правильность (accuracy)	Accuracy — степень соответствия между известным истинным значением или справочной величиной и значением, полученным по данной методике. Иногда употребляется термин trueness	Accuracy — степень близости между результатом измерения и принятым стандартным значением. *Примечание.* Термин accuracy, в отношении какого-либо набора результатов измерений, включает в себя комбинацию случайных компонентов и общую системную ошибку или компонент отклонения	Accuracy — выражает степень близости между значением, которое принято в качестве истинного (рабочий стандарт), или принятым стандартным значением (ГСО), и значением, полученным в результате выполнения методики несколько раз
Прецизионность (precision)	Аналогично определению ВОЗ	Степень близости между независимыми результатами измерений, полученными при контролируемых условиях. *Примечание.* Прецизионность зависит только от распределения случайных ошибок и не связана с истинным значением или установленным значением. Меру прецизионности обычно выражают в терминах неточности и вычисляют как стандартное отклонение результатов измерений. «Независимые результаты измерений»	Прецизионность методики выражает степень близости (степень дисперсии) между сериями измерений, полученных при параллельных измерениях одного гомогенного образца при установленных условиях. Прецизионность может исследоваться на 3 уровнях: повторяемость, промежуточная прецизионность (внутрилабораторная точность) и воспроизводимость. Возможно использование специально приготовленных образцов или растворов.

Продолжение табл. 10

1	2	3	4
		означают результаты, полученные в условиях, обеспечивающих отсутствие влияния каких-либо предыдущих результатов на тот же или похожий объект исследования. Количественные методики прецизионности очень зависят от установленных условий. Повторяемость и воспроизводимость являются определенными наборами экстремальных условий	Прецизионность методики обычно выражается как дисперсия, стандартное отклонение или коэффициент вариантности серий результатов измерений
Внутрилабораторная точность (inter-assay precision)	Выражает изменчивость внутри лаборатории: разные дни, разные аналитики, разное оборудование и т.д.	См. ICH	
Повторяемость (сходимость) (repeatability, intra-assay precision)	Прецизионность методики при ее выполнении в одних и тех же условиях в течение короткого интервала времени	1. Прецизионность в условиях повторяемости, т.е. в условиях, при которых независимые результаты измерений получены тем же методом на идентичных объектах в одной лаборатории одним оператором с использованием одного оборудования в течение короткого интервала времени. 2. Сходимость (результатов) — степень близости результатов последовательных измерений одного объекта, проведенных в одинаковых условиях измерения.	Выражает прецизионность в одинаковых условиях: тот же аналитик, оборудование, короткий интервал времени, те же реактивы

Продолжение табл. 10

1	2	3	4
		При определении повторяемости вычисляется стандартное отклонение повторяемости и предел повторяемости	
Воспроизводимость (reproducibility)	Характеристики прецизионности в межлабораторных исследованиях	Прецизионность в условиях воспроизводимости, т.е. в условиях, когда результаты измерений получаются той же методикой на идентичных объектах в разных лабораториях разными операторами с использованием разного оборудования. *Примечание.* Для обоснования воспроизводимости требуется описание изменяющихся условий. Вопроизводимость может выражаться количественно в терминах дисперсии результатов. При определении воспроизводимости вычисляются стандартное отклонение воспроизводимости и предел воспроизводимости	Выражает прецизионность при разных условиях, например: лаборатории, реактивы от разных поставщиков, аналитики, дни, оборудование от разных поставщиков и т.д.
Специфичность (selectivity)	Аналогично ВОЗ	Способность методики точно и избирательно определить анализируемое вещество в присутствии других компонентов в исследуемой среде при установленных условиях измерения	Способность методики определять безусловно анализируемое вещество в присутствии компонентов, которые могут присутствовать в пробе. Обычно это могут быть примеси, продукты распада, матрикс (биологические среды или плацебо) и т.д. Это определение имеет следующие приложения.

Продолжение табл. 10

1	2	3	4
			Проверка подлинности: обеспечить подлинность анализируемого вещества. Испытания на чистоту: обеспечить, чтобы выполненные аналитические методики позволяли правильно определить содержание примесей. Количественное определение: обеспечить точность измерения при определении содержания/активности анализируемого вещества в пробе
Предел обнаружения (limit of detection)	Аналогично ВОЗ	Наименьшее количество, которое может быть измерено с приемлемой статистической определенностью. Или наименьшее количество анализируемого вещества, которое может быть обнаружено и идентифицировано, если присутствует в пробе (АОАС[35])	Наименьшее количество анализируемого вещества в пробе, которое может быть обнаружено, но не выражено в точном количестве
Предел количественного определения (limit of quatitation)	Аналогично ВОЗ	Количество (вещества), равное или большее самой нижней точки калибровочной кривой	Наименьшее количество анализируемого вещества в пробе, которое может быть оценено количественно с приемлемой правильностью и прецизионностью

[35] АОАС — Ассоциация химиков.

Продолжение табл. 10

1	2	3	4
Линейность (linearity)	Аналогично ВОЗ	Определяет способность методики получать результаты измерения, пропорциональные концентрации анализируемого вещества. *Примечание.* Диапазон линейности является диапазоном концентрации анализируемого вещества, в пределах которого методика дает результаты измерений, пропорциональные концентрации анализируемого вещества	Способность методики (в пределах диапазона измерения) получать результаты, которые прямо пропорциональны концентрации (количеству) вещества в пробе
Диапазон применения (range)	Аналогично ВОЗ	Набор значений измеряемой величины, для которого предполагаемая ошибка средства измерения лежит в допустимых пределах	Интервал между верхним и нижним значением концентрации (количества) анализируемого компонента (включая эти значения), в рамках которого доказаны прецизионность, правильность и линейность методики
Робастность (устойчивость, robustness)	Аналогично ВОЗ	Мера способности методики давать неизмененные результаты при малых, но чувствительных изменениях параметров методики, и доказательство ее надежности при рутинном использовании	Степень воспроизводимости результатов измерений, полученных при анализе одинаковых образцов при разных минимальных изменениях условий выполнения методики

Продолжение табл. 10

1	2	3	4
Восстановление (recovery)		Часть анализируемого вещества, добавленного в пробу до анализа, обогащенные и необогащенные пробы (метод «добавок»). Процент восстановления подсчитывается по формуле: $\%R = [(CF\text{-}CU)/CA] \times 100,$ где CF — концентрация вещества, измеренная в обогащенной пробе, CU — концентрация вещества, измеренная в необогащенной пробе, CA — концентрация вещества, добавленная (измеренное значение, не зависящее от методики) в обогащенную пробу	
Стандартное отклонение (standard deviation)		Мера дисперсии относительно средней в распределении значений. Стандартное отклонение σ для генеральной совокупности n значений вычисляется по формуле: $\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n} x_i - \mu}{n}}$	

Продолжение табл. 10

1	2	3	4
		На практике обычно анализируют пробу, а не генеральную совокупность. Стандартное отклонение s для пробы вычисляется по формуле: $s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}(x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$ [36]	
Коэффициент вариабельности[37]		$RSD = \frac{\bar{\sigma}}{\bar{X}}$	% вариабельности в наборе чисел относительно их средней
Пределы повторяемости (r) и воспроизводимости (R)		$r = t_\infty + \sqrt{2} + \sigma_r$ $R = t_\infty + \sqrt{2} + \sigma_R$ где t_∞ — коэффициент Стьюдента (1,96 для $P > 95\%$), σ_r или R — стандартное отклонение при повторяемости или воспроизводимости	

[36] Более подробно о статистических методах см. ГФ XI ч. 1, с. 199—251.
[37] Отношение стандартного отклонения к средней, выражается в %.

Таблица 11

Алгоритм выбора валидируемых характеристик аналитической методики

Наименование характеристики	Основные типы методик				
	Испытание на подлинность	Испытания на чистоту		Количественные определения	
		Количественные методы	Пределы содержания	Основного действующего вещества, значимых компонентов	Распадаемость, растворение
Правильность		+	+	+	±
Прецизионность:					
• повторяемость (сходимость)		+		+	±
• внутрилабораторная точность		+		+	±
Специфичность	+	±	+	+	±
Предел обнаружения		±	+		±
Предел количественного определения		+			±
Линейность		+		+	±
Диапазон применения		+		+	±
Робастность		+		+	+

Примечание. Для большинства других давно устоявшихся методик, описанных в фармакопее (например, определение воды по Фишеру), часто требуется частичная валидация, удостоверяющая правильность методики и отсутствие значительного влияния компонентов на точность измерений.
+ — определение параметра обязательно;
± — определение параметра проводят при необходимости.

Описание характеристик

«Специфичность»

Наличие данного параметра должно доказываться практически для всех подлежащих валидации аналитических методик. Иногда в литературе можно встретить термин «селективность» методики (selectivity).

Специфичность может подтверждаться путем сравнения результатов, полученных из проб с анализируемым компонентом и без него; сравнением результатов, полученных при выполнении нескольких методик; моделированием путем добавления в исследуемый компонент примесей и т.д. Для определения специфичности методики при определении продуктов распада создают стрессовые условия (гидролиз в присутствии кислот и оснований, термический распад, фотолизис, окисление).

В случае валидации методик определения вещества в биологических средах необходимо также исследовать «чистые» пробы, полученные как минимум из 6 источников.

Возможным количественным выражением параметра «специфичность» является представленный в % от ожидаемого (известного) количества в анализируемой пробе результат измерения. Разница между полученным и теоретически определенным значением не должна быть статистически значимой при $P < 95\%$.

Правильность

Все руководства по валидации методик измерений рекомендуют оценивать параметр «правильность» в ходе контролируемого эксперимента с использованием специально подготовленных проб с известным содержанием анализируемого вещества или в сравнении результатов, полученных при использовании другой давно используемой методики.

Как правило, при валидации методики, использующейся для оценки качества субстанции, применяются стандарты установленной чистоты, или проводится сравнение с другой, например фармакопейной методикой, или может быть оценена теоретически по результатам тестов на линейность, прецизионность и специфичность.

При валидации методик для оценки качества лекарственного препарата, как правило, используются следующие подходы:

- оценка на модельных смесях «плацебо» и с добавлением стандартов;
- метод «добавок» в исследуемые образцы;
- сравнение результатов, полученных с помощью валидируемой методики, с результатами, полученными с помощью референс-методики;
- теоретическое определение по результатам тестов на линейность, прецизионность и специфичность.

При валидации методик по определению примесей чаще всего используется метод «добавок» в образцы препарата и сравнение с референс-методиками.

Правильность выражается в процентном отношении определенного с помощью методики «добавок» аналита к пробе (вариант — см. табл. 10 для показателя «восстановление») или как разность между средним арифметическим полученных значений и значением, принятым в качестве истинного, с учетом соответствующих доверительных границ. Другим показателем правильности является системная погрешность (bias), вычисляемая при оценке значимости отклонений (при регрессионном анализе).

Для методик, основанных на физико-химических методах, разброс значений при измерении «плацебо» не должен превышать (1%, при измерении стандартных растворов (2% от известного количества, относительное стандартное отклонение (объединенных результатов) — не более 2%.

Средняя арифметическая данных, полученных в диапазоне применения биологических методик, не должна отклоняться более чем на 15% от известного значения и на 20% в точке НПКО.

Количество рекомендуемых концентраций: от 3 до 6 (например 70%, 100% и 130%[38] + «плацебо»), повторностей: 3, 5 или 10.

«Предел обнаружения»

Общий подход к установлению предела обнаружения для инструментальных методов заключается в использовании подхода «плацебо + 3σ», где σ — стандартное отклонение при измерении «плацебо». При данном подходе предполагается, что доза больше 3σ может быть увеличена за счет влияния «плацебо» на точность методики не более чем на 1%. Если «плацебо» не дает никаких измеряемых результатов, вместо «плацебо» используются пробы с минимально возможной концентрацией измеряемого вещества. Для качественных методик рекомендуется вычислять % положительных/негативных результатов, полученных при определении 10 образцов для каждой концентрации, и по кривой доза/ответ определять достоверный предел обнаружения. При валидации методик, имеющих ограниченную избирательность (шум базовой линии), проводят сравнение результатов, получаемых при измерении проб с низкой концентрацией

[38] % от количества, указываемого на этикетке, или рабочего определяемого количества (например, после экстракции).

и пробы «плацебо». Приемлемой считается величина соотношения «сигнал: шум» 2:1 или 3:1. Другим вариантом определения параметра является вычисление по формуле ПО = 3,3 σ/S, где σ — стандартное отклонение, S — тангенс угла наклона калибровочной кривой.

Для биологических методик приемлемым считается ответ, равный 2 или 3 стандартным отклонениям при измерении проб с нулевой концентрацией. В приведенном в руководстве примерном плане оценки параметра «предел обнаружения» для иммунологических методик измерения (ОП — оптическая плотность) исследование пробы со стандартной концентрацией анализируемого вещества и пробы с нулевой концентрацией проводят 3 раза в 2 повторностях. Предел обнаружения рассчитывается по формуле 3 × стандартное отклонение в «нулевой» пробе/ОП образца/концентрация вещества в образце.

«Предел количественного определения» (ПКО)

Методология для оценки данного параметра, изложенная в руководстве ICH, приблизительна та же, что и для параметра «предел обнаружения». Теоретически предел количественного определения можно вычислить по формуле ПКО = 10σ/S, где σ — стандартное отклонение получаемых измерений ответа, S — тангенс угла наклона калибровочной кривой. Стандартное отклонение вычисляется на основании результатов измерения «плацебо».

Другая методика вычисления ПКО с использованием стандартного отклонения, получаемого при статистической обработке результатов измерения «плацебо», заключается в представлении ПКО как 5σ, 6σ или 10σ. Затем теоретические данные подтверждаются при измерении разведений в концентрациях, близких к теоретическому ПКО.

Также нижний предел количественного определения (НПКО) может быть определен по калибровочной/стандартной кривой. Для построения кривой необходимо как минимум 8—10 точек: результаты измерения в «плацебо» (биологическая среда без внутреннего стандарта), результаты измерения в нулевой пробе (биологическая среда с внутренним стандартом), 6—8 разведений в исследуемом диапазоне, включая предполагаемый предел количественного определения. Должны выполняться следующие условия:

- ответ в точке НПКО должен быть в 5 раз выше, чем в плацебо;
- ответ (пик) должен быть отчетливым, определяемым, дискретным и воспроизводимым с прецизионностью 20% и правильностью 80—120%.

Диапазон применения и линейность

Руководство ICH дает четкие требования к диапазонам применения методик:

- для количественного определения: 80—120% от установленной в спецификации концентрации;
- для однородности дозирования: 70—130% от установленной в спецификации концентрации;
- для испытаний на растворение: ±20% от установленного диапазона, т.е. если при контролируемом высвобождении за 1-й час в раствор переходит 20%, а за 24 часа — 90%, то валидируемый диапазон должен составлять от 0 до 110%;
- при испытаниях на чистоту: от 50 до 120% от количества, указанного в спецификации.

Линейность определяется визуально по кривой регрессии, построенной по результатам измерений с определенным количеством повторностей. Для некоторых данных для получения линейной зависимости доза/ответ может потребоваться математическая трансформация. При наличии линейной зависимости определяются коэффициент корреляции, точка пересечения с осью Y, тангенс угла наклона кривой регрессии и остаточная сумма квадратов отклонений. Для биологических методов, часто не имеющих линейности даже после математических преобразований, взаимосвязь доза/ответ описывается соответствующей функцией. Помимо регрессионной кривой доза/ответ может строиться график разброса остатков/квадратов остатков (разницы между теоретическим и полученным результатам измерений) Y относительно значения X. Равномерное распределение остатков относительно прямой доказывает линейность методики. Количество рекомендуемых концентраций вещества, необходимых для построения кривой, варьирует от 5 (4) до 8 (6), количество повторностей — от 3 до 10.

Прецизионность

Прецизионность (precision), или, по другим переводам, точность, оценивается 2 наиболее распространенными критериями: повторяемостью (сходимостью) и воспроизводимостью[39], выражаемыми стандартным отклонением и пределами повторяемости или воспроизводимости.

[39] Внутрилабораторная прецизионность (точность) — частный случай воспроизводимости (ГОСТ Р ИСО 5725).

Для целей валидации на предприятии проводится оценка повторяемости и внутрилабораторной прецизионности (точности/прецизионности). Межлабораторная прецизионность (воспроизводимость) проводится с целью валидации методик, включаемых в фармакопею.

Повторяемость

Для проведения теста на повторяемость проводится или 9 определений на выбранном диапазоне работы методики, или 6 определений при заданной концентрации (например, 100% от количества, указываемого на этикетке).

При определении повторяемости вычисляется стандартное отклонение повторяемости и предел повторяемости (формулы приведены в табл. 10).

Как правило, относительное стандартное отклонение не должно превышать 2% (или 1,5% для теста пригодности системы).

Внутрилабораторная точность

При оценке внутрилабораторной точности рекомендуется использовать планируемый эксперимент, в котором исследуется влияние случайных факторов (дни, аналитики, оборудование и т.д.). Прецизионность оценивается по величине стандартного отклонения, относительного стандартного отклонения (коэффициента вариабельности) и доверительному интервалу. Также для оценки значимости различий в получаемых результатах Eurachem и группа стандартов ГОСТ Р ИСО 5725 рекомендуют вычислять пределы повторяемости и воспроизводимости[40] при доверительной вероятности P > 95%.

Требования к эксперименту:

- 2 аналитика;
- анализ проводится в разные дни;
- измеряются 1—3 концентрации в диапазоне применения методики, количество повторностей: 3, 5 или 10;
- разные приборы (разные серии колонок и т.д.).

Рекомендуемые критерии приемлемости:

- для методик определения веществ в биологических средах: прецизионность определений при каждой концентрации не должна превышать 15% коэффициента вариабельности (относительного стандартного отклонения) и 20% коэффициента для концентрации, соответствующей нижнему пределу диапазона применения методики;

[40] См. табл. 10 для определений.

- для методик физико-химического анализа: сравнительное стандартное отклонение не более 2,5%.

В рамках работ по оценке точности (правильности и прецизионности) методик для определения веществ в биологических средах FDA также рекомендует провести оценку эффективности экстракции анализируемого вещества из пробы (т.е. восстановления — recovery). Данный тест проводится путем сравнения результатов определения 3 концентраций анализируемого вещества (низкой, средней и высокой) с неэкстрагируемым стандартом, который представляет собой 100% коэффициент экстракции.

Робастность (устойчивость)

Робастность, по сути, представляет собой тест оценки прецизионности и/или правильности в условиях «наихудшего» случая.

Оценка этого параметра методики обычно проводится на стадии ее разработки. При оценке робастности изучается степень влияния условий, которые могут повлиять на точность результатов, получаемых при выполнении той или иной методики. При разработке методики проводится также проверка пригодности системы[41].

Как правило, оцениваются:

1. Стабильность приготовленных проб: влияние температуры (0°C и 22°C), сроки использования (24 и 72 часа). Отклонение: не более 1%.

2. Незначительные изменения условий методики (pH, температура колонок (экстракции), аналогичные колонки, стабильность хроматографической системы). Критерии: выполнение теста пригодности системы (снижение количества теоретических тарелок не более чем на 50%).

Для некоторых специфических методик (хроматографические методики, анализ в биологических средах, иммунологический анализ, микробиологические и вирусологические анализы) рекомендуется оценивать также дополнительные характеристики, такие как стабильность измеряемого вещества, стабильность разведений стандартов, стабильность вещества и стандарта после подготовительных стадий и т.д.

На следующем этапе планирования валидации аналитических методик разрабатывается дизайн эксперимента, включающий объем

[41] Рекомендации по проведению проверки системы высокоэффективной жидкостной хроматографии приводятся, например, в монографии USP «Хроматография», рекомендациях FDA.

испытаний для получения фактических данных и выбор математического аппарата для их анализа.

Некоторые типы дизайнов экспериментов приводятся в ГФ XI (например, схема Латинского квадрата), Европейской фармакопее (полностью рандомизированное исследование, перекрестный дизайн) и др. Выбор дизайна обуславливается особенностью валидируемой методики и определяемых характеристик.

В табл. 12 сведены рекомендации по объему исследований, необходимых для оценки наиболее часто валидируемых характеристик аналитической методики.

Как правило, валидации подлежат методики количественного определения основного действующего вещества, методики определения примесей[42], методики растворения (распадаемости), методики идентификации и отдельные специфические методики (например, определение биологической активности).

Эксперимент рекомендуется проводить так, чтобы данные для оценки валидационных характеристик по возможности были получены одновременно, например: для специфичности, линейности, диапазона применения, правильности и прецизионности (точности).

Рациональный и статистически выверенный подход к проведению эксперимента по валидации аналитической методики описан в статье Дональда Х.Вида «Валидация аналитических методик: подход. интегрированный со статистическими методами»[43]. И хотя он разработан для валидации методик на базе ВЭЖХ, он применим и к другим методикам.

На основании предварительных данных, полученных в ходе разработки методики, в частности, влияния «плацебо», обосновывается использование различных подходов к проведению тестов: модельные смеси; метод «добавок», разведения стандартов, образцы готового препарата и возможность объединения работ по валидации различных методик (как правило, для количественного определения и определения примесей).

[42] см. также Руководство ICH 3QB «Impurities in new drug products» — www.ich.org или в книге «Надлежащая производственная практика лекарственных средств: активные фармацевтические ингредиенты, готовые лекарственные средства, руководства по качеству, рекомендации PIC/S». — Киев: «Морион», 2001. — С. 191-200.

[43] Donald D.Weed. A statically integrated approach to analytical method validation // Pharmaceutical technology. — 1999. — Oct. — P. 116-128.

Так как практически для всех валидируемых методик должен проводиться тест на специфичность методики (см. табл. 11), целесообразно проводить его первым. Результаты определений при первичном определении могут быть использованы в тестах на «правильность», «предел обнаружения», «предел количественного определения» и «робастность» при условии совпадения требуемых концентраций (см. табл. 12 — совпадение по использованию «плацебо», «разведение стандартов» и т.д.).

Следовательно, необходимо определить диапазон тестирования, в пределах которого будут оцениваться другие характеристики методики. Диапазон тестирования для методик количественного определения основного действующего вещества составляет 80—120%, однородности дозирования — 70—130% (зависит от количества анализируемого вещества, указываемого на этикетке)[44]. Количество концентраций (т.е. шаг разведений) в рамках этого диапазона будет от 3 до 6 (по разным руководствам). При этом для оценки большинства характеристик достаточно использовать пробы с известным содержанием анализируемого вещества (т.е. разведения стандарта), а для специфичности и правильности — растворы со стандартом необходимо приготовить в присутствии «плацебо».

Д.Х.Вид предлагает использовать 5 концентраций стандартов: 80%, 90%, 100%, 110% и 120%, что удовлетворяет требованиям для большинства определяемых характеристик, и проводить по 4 определения для каждой концентрации (по 2 на каждый набор растворов стандартных образцов), в целом получая 20 определений. Данное количество определений позволяет и выявить значимые ошибки методики, и снизить степень неопределенности[45]. С другой стороны, одномоментное использование большого количества разведений (например: 1%, 20—25%, 50%, 75%, 100%, 125% и 150%) может оказаться более практичным.

Таким образом, например, данные эксперимента с определением 4-го ряда проб (2 — с растворами стандарта, 2 — с растворами стандарта и «плацебо»), определяемые одним оператором и на одном оборудовании, могут использоваться для оценки характеристик «диапазон применения», «линейность», «правильность», «повторяемость», «пределы обнаружения» и как начальные данные для теста внутрилабораторной прецизионности (точности).

[44] Руководство ICH Q2B.

[45] Известно, что стандартное отклонение, вычисляемое на 30 и более вариантах, может считаться стандартным отклонением всей генеральной совокупности.

Рекомендации по объему лабораторных исследований

Наименование характеристики	Использование стандартных образцов			Использование проб продукта		
	ICH	FDA	Eura-chem	ICH[46]	FDA	Eura-chem
Диапазон применения	+	+			±	
Линейность	+					
Правильность	+	+	+	±		±
Специфичность	+	+		+		
Повторяемость (сходимость)	+	+	+	±		±
Внутрилабораторная воспроизводимость	+	+				
Пределы обнаружения	+	+				
Робастность[47]	+	+		±		

При оценке внутрилабораторной прецизионности (точности) и робастности исследуется влияние ряда факторов, и, следовательно, рациональным будет использование многофакторного «анализа дисперсии» ANOVA и анализа вариабельности компонентов. Д.Х.Вид выделяет (для методик на базе ВЭЖХ) 8 факторов, считая достаточным проведение измерений 2 проб из однородного источника и стандартного раствора в 2 повторностях двумя операторами в течение 2 дней.

[46] При дополнительном применении другой (хорошо известной) методики.

[47] Как для определения правильности или прецизионности, но с измененными условиями эксперимента, включая другие условия.

Таблица 12

при валидации аналитических методик

Использование плацебо			Количество концентраций			Количество измерений		
ICH	FDA	Eura-chem	ICH	FDA	Eura-chem	ICH	FDA	Eura-chem
+			5	4	7	15?	12	>10 на 1 концентр.
			5	4	6	15?	12	>10 на 1 концентр.
±			3	3		9	9–15	>10 на 1 концентр.
+	+	+	3	> 6 источ-ников		9		
			3 или 1	3 или 4		9 или 6	5 или 10	>10 на 1 концентр.
	±			3			9	
+	±			3			9	>10 на 1 концентр.
+	±		3 — на каждый случай			9 — на каждый случай		См. сноску [9]

Возможности взаимного использования данных показаны в табл. 13.

Следует отметить, что для корректного использования приведенной схемы необходимо учитывать характер валидируемой методики (количественное определение или примеси), используемые концентрации и методологию (разведения стандартов, метод «добавок», модельные смеси), протоколы экспериментов (использование данных 1-й стадии).

После создания предварительного дизайна исследования можно приступать к разработке плана валидации и всей необходимой документации.

Таблица 13

Возможное взаимное использование для валидации результатов, полученных в разных тестах

Данные теста	Специфичность (до стресс-условий)	Правильность	Линейность и диапазон применения
Правильность	Данные по «плацебо»		Данные по модельным смесям (для примесей)
Повторяемость	Данные по образцам	М.б. использована 1 из концентраций	Данные по стандартным растворам
Внутрилабораторная точность (1-я стадия)		Данные по модельным смесям (для примесей) — одна концентрация 100%	Данные по стандартным растворам (количественное определение и примеси)
Линейность и диапазон применения	Данные по стандартным растворам	Данные по модельным смесям (для примесей)	
ПО и ПКО	Данные по «плацебо», по смесям	Данные по модельным смесям	Данные по модельным смесям/растворам (для примесей)
Робастность (1-я стадия)	Данные по образцам	Данные по модельным смесям (для примесей)	Данные по стандартным растворам (количественное определение и примеси)

Как правило, общие принципы валидации аналитических методик, принятые предприятием, излагаются в соответствующей стандартной операционной процедуре, в специальной СОП (или инструкции) описывается порядок проведения валидации отдельной методики, формы протокола валидации и отчета.

Все лабораторное оборудование, использующееся при валидации методик, должно пройти квалификацию функционирования.

При выполнении утвержденных СОП испытаний исполнители должны фиксировать все отклонения, имевшие место в процессе испытаний или анализа, с той же тщательностью, что и получаемые результаты.

Таблица 14

Характеристика	Для количественных определений		Для испытаний на чистоту	
	Количество испытаний	Критерии	Количество испытаний	Критерии
Повторяемость	6×1	<2,0%		<5%
Внутрилабораторная точность	3×3	<2,5%		<10%
Воспроизводимость	3×3	<3,0%		<15%

В отчете кратко описываются проведенные испытания и приводится заключение о том, выдержала ли методика валидацию, и устанавливаются фактические сроки проведения ревалидации.

Проект СОП по проведению валидации аналитических методов приведен в Приложении.

При передаче аналитических методик в контрактную лабораторию (или воспроизведении фармакопейных методик) проверяется лишь прецизионность методики:

1) прецизионность — повторяемость и внутрилабораторная точность;

2) прецизионность — воспроизводимость (только при передаче методик).

Объемы испытаний и критерии приемлемости тестов такие же, как и при полной валидации.

Максимальная разность между средними значениями, полученными в разных лабораториях, не должна быть статистически достоверной или менее 2%.

ВАЛИДАЦИЯ ПРОЦЕССОВ ОЧИСТКИ

К процессам очистки на фармацевтическом производстве относятся как процессы очистки оборудования, так и процессы очистки лабораторной посуды и помещений, санитарная обработка производственных помещений, очистка одежды и т.д.

В случае процедур очистки производственного оборудования основная задача валидации — убедиться, что процедуры очистки оборудования адекватны и предохраняют от перекрестной контаминации (т.е. контаминации одного продукта другим). Наряду с перепутыванием упаковочных материалов неадекватная очистка