

УДК 661.12
ББК 35.6
Ф 247

Ф 247 Руководство для предприятий фармацевтической промышленности / методические рекомендации. М.: — Издательство «Спорт и Культура - 2000», 2007. 192 с.

ISBN 978-5-901682-46-4

УТВЕРЖДЕНО И ВВЕДЕНО В ДЕЙСТВИЕ:



решением общего собрания членов
Ассоциации российских
фармацевтических производителей
от 10 августа 2007 г., протокол № 55.

Рекомендовано к использованию Федеральной службой по надзору в сфере здравоохранения и социального развития специалистами, занятым в сфере обращения лекарственных средств

Рецензенты: ГОУ «Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия»,
Союз профессиональных фармацевтических организаций,
Некоммерческое партнёрство «Национальная фармацевтическая инспекция»
Все права защищены.
ВВЕДЕНО ВПЕРВЫЕ

УДК 661.12
ББК 35.6

ISBN 978-5-901682-46-4

© Издательство «Спорт и Культура — 2000», о-макет, 2007
© ООО «Фармацевтическая промышленность», 2007
© Коллектив авторов, 2007

ВСТУПИТЕЛЬНОЕ СЛОВО

Уважаемые коллеги!

Процессы развития фармацевтической отрасли в России требуют гармонизации национального законодательства с требованиями Европейского Союза, разработки соответствующей нормативно-правовой базы, а также внедрения на предприятиях и организациях отрасли международных стандартов, прежде всего надлежащей производственной практики (GMP).

Создание в России фармацевтической отрасли, работающей по мировым стандартам производства и качества (GMP), — это системная и стратегическая задача. В ее решении, как в фокусе, сходятся целый ряд проблем: от развития конкурентоспособности экономики до укрепления обороноспособности страны. Прежде всего, необходимо правовое поле, обеспечивающее создание конкурентной среды, в которой преимущества получают добросовестные производители.

Безусловно, использование механизма частно-государственного партнерства, а именно Росздравнадзора и Ассоциации российских фармацевтических производителей (совместная разработка руководств, согласование их положений, использование опыта специалистов, работающих в отрасли и т. п.), — это новаторский подход к решению государственных задач.

Данное Руководство должно послужить основой подготовки новых нормативно-правовых документов, которые будут касаться всех стадий обращения лекарственных средств.

Убежден, в России сейчас есть все возможности, чтобы к началу 2010 года полностью перейти на Правила органи-

зации производства и контроля качества лекарственных средств, гармонизированные с европейскими стандартами GMP. Но достижение такого результата, безусловно, требует четко скоординированной работы органов государственной власти, представителей бизнеса и гражданского общества.

Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере здравоохранения
и социального развития

Н.В. Юргель

**РУКОВОДСТВО
ПО ВАЛИДАЦИИ МЕТОДИК АНАЛИЗА
ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ
(МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ)**

**Под редакцией: Н.В. Юргеля, А.Л. Младенцева,
А.В. Бурдейна, М.А. Гетьмана, А.А. Малина,
В.В. Косенко**

Часть I

РАЗРАБОТАНО:

Ассоциацией российских фармацевтических производителей

РАЗРАБОТЧИКИ:

В.Л. Багирова, доктор фарм. наук, профессор;
А.И. Гризодуб, доктор хим. наук, профессор;
Т.Х. Чибиляев, канд. фарм. наук;
Д.А. Леонтьев, канд. фарм. наук;
Н.А. Ляпунов, доктор фарм. наук, профессор;
И.С. Терно, канд. хим. наук;
И.А. Касакин.

Юргель Н.В. — Руководитель Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения и социального развития, д.м.н., заслуженный врач РФ

Младенцев А.Л. — Заместитель руководителя Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения и социального развития

Бурдейн А.В. — Советник руководителя Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения и социального развития, к.м.н.

Гетьман М.А. — Советник руководителя Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения и социального развития, к.ф.н.

Малин А.А. — Уполномоченный по качеству Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения и социального развития, к.х.н.

Косенко В.В. — Начальник Управления государственного контроля в сфере обращения медицинской продукции и средств реабилитации инвалидов Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения и социального развития, к.ф.н., заслуженный работник здравоохранения

ПРЕДИСЛОВИЕ

В соответствии с Федеральным Законом РФ «О лекарственных средствах» (ст. 19 «Государственная регистрация лекарственных средств», п. 9) для государственной регистрации лекарственного средства юридическое лицо, подающее заявление о государственной регистрации, представляет определенные документы. Приказом Министерства здравоохранения и социального развития РФ от 30 октября 2006 г. № 736 принят Административный регламент Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения и социального развития по исполнению государственной функции по государственной регистрации лекарственных средств (далее Административный регламент), который предусматривает в структуре регистрационного досье данные о валидации аналитических методик [1].

В соответствии с Федеральным законом РФ «О лекарственных средствах» (ст. 13 «Производство лекарственных средств») производить лекарственные средства необходимо по соответствующим правилам организации производства и контроля качества; при этом запрещается производство лекарственных средств, не прошедших государственную регистрацию в РФ. В соответствии с ГОСТ Р 52249-2004 «Правила производства и контроля качества лекарственных средств» [2] (раздел 6) отдел контроля качества должен обеспечить валидацию методик контроля качества. Однако ГОСТ Р 52249-2004 не регламентирует требования к проведению валидации аналитических методик и испытаний [2].

С учетом вышеизложенного актуальной проблемой является введение в РФ руководства, содержащего методические рекомендации относительно терминологии вали-

дации, методологии проведения валидации и критериев приемлемости валидации методик анализа лекарственных средств. Рационально, чтобы эти методические рекомендации были гармонизированы с положениями соответствующего руководства ICH (International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use — Международная конференция по гармонизации технических требований к регистрации лекарственных средств для применения у человека) и Европейского Союза (ЕС), поскольку ГОСТ Р 52249-2004 гармонизирован с руководством по GMP (Good Manufacturing Practice), принятым в Европейском Союзе (ЕС) [3], а содержание сведений о лекарственных средствах в регистрационных досье, установленных в приложении 3 к Административному регламенту [1], в целом соответствует структуре регистрационного досье в современном международном формате и формате ЕС [4, 5]. Такая гармонизация необходима также в связи с п. 1.5 Административного регламента, в котором установлено, что «при осуществлении государственной регистрации к российским и зарубежным лекарственным средствам предъявляются одинаковые требования» [1].

Данное руководство разработано на основании руководства CPMP/ICH/381/95 [6], а также Технического руководства Европейской Фармакопеи по разработке монографий [7]. Эти нормативные документы регламентируют терминологию и методологию проведения валидации аналитических методик [6], а также специфику проведения валидации для некоторых фармакопейных методов анализа [7], однако в них отсутствуют критерии приемлемости. В связи с этим в раздел D настоящего руководства включены материалы Государственной Фармакопеи Украины («Валидация аналитических методик и испытаний») [8], «Статистический анализ результатов химического эксперимента» [9], а также научные рекомендации по критериям проведения валидации для ме-

тодик количественного анализа [10,11,12,13]. Кроме того, в введение к данному руководству были внесены положения Фармакопеи США (30-е издание) относительно верификации фармакопейных методик и испытаний из общей статьи <1010> «Analytical Data — Interpretation and Treatment» («Результаты анализа — интерпретация и обработка») [14], а также из проекта общей статьи Фармакопеи США <1226> «Verification of Compendial Procedures» («Верификация фармакопейных методик») [15].

В настоящем руководстве введены метрологические термины «правильность» и «прецизионность», определения которых в целом соответствуют таковым в ГОСТ Р ИСО 5725-1-2002 [16]. В соответствии с РМГ 29-99 «Метрология. Основные термины и определения» [17] неопределенность результатов анализа характеризовали доверительным интервалом (а не стандартным отклонением).

Данное руководство предназначено для юридических лиц, которые подают заявление о государственной регистрации лекарственного средства в РФ, экспертов, которые проводят экспертизу при осуществлении государственной регистрации, а также для разработчиков и производителей лекарственных средств. Данное руководство рекомендуется применять при планировании и проведении валидации аналитических методик, применяемых для контроля качества действующих и вспомогательных веществ, промежуточных продуктов и готовых лекарственных препаратов, а также при планировании и проведении научных исследований по разработке лекарственных средств и составлении регистрационных досье.

Настоящее руководство имеет следующую структуру:

- в разделе «Предисловие» дано обоснование необходимости разработки данного руководства и приведены соответствующие пояснения;
- в разделе «Введение» дана краткая характеристика объекта стандартизации, а также представлен идентичный

- перевод положений общей статьи <1010> «Analytical Data — Interpretation and Treatment. Method Validation» («Результаты анализа — интерпретация и обработка. Валидация методик») Фармакопеи США (30-е издание) [15] и проекта общей статьи Фармакопеи США «Verification of Compendial Procedures» («Верификация фармакопейных методик») относительно верификации фармакопейных методик и испытаний;
- в разделах А и В настоящего руководства представлен идентичный перевод, соответственно, частей I и II руководства CPMP/ICH/381/95 «Note for Guidance on Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology» [6] без изменения их объема и содержания с сохранением нумерации пунктов;
 - в части С изложен идентичный перевод текста руководства Европейской Фармакопеи «Technical Guide for the Elaboration of Monographs» («Техническое руководство по разработке монографий») [7], относящегося к специфике валидации некоторых фармакопейных методов анализа;
 - в раздел Д «Критерии проведения валидации для методик количественного анализа» включены идентичные переводы из статей Государственной Фармакопеи Украины «Валідація аналітичних методик і випробувань» («Валидация аналитических методик и испытаний») [8], а также научные рекомендации по оценке результатов валидации [10–13];
 - в приложении 1 «Расчет неопределенности функции нескольких случайных переменных» приведены рекомендации относительно расчета неопределенности для методик количественного анализа на основании идентичного перевода раздела 10 общей статьи Государственной Фармакопеи Украины «Статистичний аналіз результатів хімічного експерименту» («Статистический анализ результатов химического эксперимента») [9];

- в разделе «Библиография» представлено библиографическое описание нормативных документов и научных статей, ссылки на которые приведены в тексте данного руководства.
- В руководство внесены такие редакционные изменения:
- в разделе А данного руководства вместо упоминания заявок на регистрацию, подаваемых в ЕС, Японии и США, дана ссылка на положения Административного регламента [1];
 - в разделе А дано примечание относительно разделов регистрационного досье в форматах CTD и приложения 1 к Директиве 2003/63/ЕС (с библиографическими ссылками на эти документы), в которых приводят данные о валидации аналитических методик; это сделано в интересах юридических лиц, подающих заявление о регистрации зарубежных лекарственных препаратов в РФ и препаратов отечественного производства за рубежом;
 - в разделе С приведены номера статей Европейской Фармакопеи, в которых описаны методы анализа; рядом с первым приведенным номером дана сноска и в конце страницы указано: «Здесь и далее по тексту цифры в скобках обозначают номер статьи Европейской Фармакопеи, в которой описан данный метод анализа: European Pharmacopoeia. — 2.2.7. Optical Rotation. Рекомендуется пользоваться соответствующими статьями Европейской Фармакопеи до введения аналогичных гармонизированных статей в Государственную Фармакопею РФ». Далее в сносках указывали только номер и название статьи Европейской Фармакопеи.

ВВЕДЕНИЕ

В данном руководстве описываются процедуры, применяемые для валидации методик и испытаний¹, включаемых в регистрационные и производственные документы на лекарственные средства (действующие вещества, готовые лекарственные препараты), промежуточные продукты и вспомогательные вещества. Поскольку в нормативные документы, содержащие спецификации и описание методик контроля качества лекарственных средств, включают различные инструментальные и неинструментальные испытания (определение подлинности, контроль примесей, количественное определение и др.), подходы к валидации испытания зависят от его типа и применяемого аналитического метода, что требует соответствующих методических рекомендаций.

Все методики и испытания, включенные в фармакопеи сторон — участников ИСН (Европейская Фармакопея, Фармакопея США и Фармакопея Японии), являются валидованными, и требуют только проведения верификации (проверки). Верификация должна подтвердить на основании экспериментальных данных, что данная лаборатория в состоянии корректно воспроизвести фармакопейную методику или испытание (т. е., для конкретного аналитического оборудования, для данных используемых реактивов, в данных условиях окружающей среды, при выполнении анализа аналитиками данной лаборатории и т. п.). Фармакопейные методики могут использоваться для контроля качества готовых лекарственных препаратов только после подтверждения, что конкретный

¹ Под «испытанием» понимают процедуру выполнения анализа в соответствии с аналитической методикой, описанной в нормативном документе, в совокупности с требованиями к полученным результатам. Результатом проведения испытания является ответ на вопрос, соответствует или нет данное лекарственное средство требованиям нормативной документации.

состав не приводит к неприемлемому ухудшению правильности линейности, или прецизионности методики. Нельзя без экспериментального подтверждения предполагать, что валидированная фармакопейная методика или испытание будут давать корректные результаты для лекарственного препарата с иным составом, чем тот, который использовался для валидации фармакопейных методик и испытаний [14, 15].

А. ВАЛИДАЦИЯ АНАЛИТИЧЕСКИХ МЕТОДИК: ТЕРМИНЫ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ

1. Введение

В соответствии с административным регламентом [1] в регистрационном досье (часть А) должны быть представлены сведения о валидации аналитических методик, применяемых для контроля качества действующего вещества и готового лекарственного препарата.

Примечание. В регистрационном досье в формате CTD информацию о валидации аналитических методик для контроля качества действующего вещества, вспомогательных веществ (при необходимости) и готового лекарственного препарата приводят, соответственно, в пп. 3.2.S.4.3, 3.2.P.4.3 и 3.2.P.5.3, имеющих название «Validation of Analytical Procedures» («Валидация аналитических методик») [4]. Для критических испытаний, применяемых при производственном процессе, результаты валидации аналитических методик представляют в п. 3.2.P.3.5 «Process Validation and/or Evaluation» («Валидация процесса и/или его оценка»).

В регистрационном досье в соответствии с приложением 1 к Директиве 2003/63/ЕС указанные сведения приводят, соответственно, в п. 3.2.1.4 «Control of active substance(s)» («Контроль активной субстанции(й)»), п. 3.2.2.4 «Control of excipients» («Контроль вспомогательных веществ»), п. 3.2.2.5 «Control of the finished medicinal product» («Контроль готового лекарственного препарата») и п. 3.2.2.3 «Manufacturing process of the finished medicinal product» («Процесс производства готового лекарственного препарата») [5].

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

В данном разделе рассматриваются характеристики аналитических методик (испытаний), подлежащие валидации (далее «валидационные характеристики»). Валидационные характеристики методик, применяемые для целей идентификации, контроля примесей и количественного определения, приведены в табл. 1.

2. Аналитические методики, подлежащие валидации

В данном разделе рассматривается валидация для следующих испытаний:

- испытания на идентификацию (подлинность);
- количественные испытания для определения примесей;
- испытания на предельное содержание¹ для контроля примесей;
- испытания для количественного определения действующего вещества в образцах активной субстанции или готового лекарственного препарата, а также для количественного определения других компонентов лекарственного препарата (например, консервантов).

Все аналитические методики и испытания, включенные в нормативные документы, должны быть валидированы. Однако для валидации некоторых испытаний, например, «Растворение» или «Определение размера частиц», могут потребоваться другие валидационные процедуры, не описанные в данном руководстве.

¹ Испытания на предельное содержание — это такие испытания, которые регламентируют содержание примесей не выше некоторого установленного уровня.

Краткая характеристика рассматриваемых испытаний

Испытания на идентификацию предназначены для подтверждения подлинности анализируемого вещества в образце. Обычно это достигается путем сравнения каких-либо свойств (например, спектральных характеристик, хроматографического поведения, химической реакционной способности и т. д.) испытуемого и стандартного образцов.

Испытания, предназначенные для контроля примесей, могут быть как количественными, так и предельными. Назначение обоих испытаний — характеризовать чистоту образца. Для валидации количественных и предельных испытаний необходимы различные валидационные характеристики.

Количественное определение предназначено для определения количества анализируемого вещества в образце. При валидации методик количественного определения действующих веществ и других компонентов лекарственного препарата применяют одинаковые валидационные характеристики. Такие же валидационные характеристики могут быть применимы к методике количественного определения, связанной с другим испытанием (например, «Растворение»).

Валидационные характеристики и требования

Набор исследуемых валидационных характеристик зависит от назначения аналитической методики. Ниже представлены типичные валидационные характеристики.

Правильность (Accuracy)

Прецизионность (Precision)

Сходимость (Repeatability)

Внутрилабораторная прецизионность (Intermediate Precision)

Специфичность (Specificity)

Предел обнаружения (Detection Limit)

Предел количественного определения (Quantitation Limit)

Линейность (Linearity)

Диапазон применения (Range)

Ниже дано определение каждой из представленных валидационных характеристик. В табл. 1 приведены валидационные характеристики, которые считаются наиболее важными при валидации различных аналитических методик. Этот список следует рассматривать как типовой для указанных испытаний (аналитических методик), но ино-

Таблица 1

Характеристики	Типы аналитических методик			
	Идентификация	Испытания на примеси		Количественное определение: — растворение (только определение), — содержание/активность
		Количественные	Предельные	
Правильность	—	+	—	+
Прецизионность:				
Сходимость	—	+	—	+
Внутрилабораторная прецизионность	—	+*	—	+*
Специфичность **	+	+	+	+
Предел обнаружения	—	—***	+	—
Предел количественного определения	—	+	—	—
Линейность	—	+	—	+
Диапазон применения	—	+	—	+

«—» — характеристика обычно не исследуется;
«+» — характеристика обычно исследуется;
* — в тех случаях, когда проводится исследование воспроизводимости, исследование внутрилабораторной прецизионности не требуется;
** — недостаток специфичности испытания можно компенсировать другим (другими) дополнительным(и) испытанием(ями);
*** — может потребоваться в некоторых случаях (например, когда предел определения и нормируемый предел содержания определяемой примеси близки).

гда возможны исключения, которые рассматриваются отдельно в каждом конкретном случае. Как правило, на стадии разработки методики изучается также валидационная характеристика робастность (Robustness).

В следующих случаях может потребоваться повторное проведение валидации (ревалидация):

- изменения в синтезе действующего вещества;
- изменения в составе готового лекарственного препарата;
- изменения в аналитической методике.

Объем проведения повторной валидации определяется спецификой изменений. Повторная валидация может требоваться и в иных случаях.

Термины и определения

1. Аналитическая методика (analytical procedure) — это способ проведения анализа, т. е. детальное изложение всех операций, необходимых для выполнения испытания. Она включает описание подготовки испытуемых образцов, стандартов и реактивов; описание используемого оборудования с указанием параметров; условия получения калибровочных кривых; использование расчетных формул и т. д.

2. Специфичность (specificity) — способность однозначно оценивать анализируемое вещество в присутствии других компонентов, которые могут присутствовать в образце. Это могут быть примеси, продукты разложения, вспомогательные вещества и т. д.

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

Специфичность для различных типов испытаний означает следующее.

Идентификация: доказательство того, что идентифицировано именно анализируемое вещество.

Испытания на примеси: доказательство того, что каждое испытание на примеси позволяет однозначно характеризовать содержание примесей в образце (например, испытания «Сопутствующие примеси», «Тяжелые металлы», «Содержание остаточных количеств органических растворителей» и др.).

Количественное определение (содержание или активность): доказательство того, что методика позволяет точно и правильно установить содержание или активность именно анализируемого вещества в образце.

3. Правильность или точность (accuracy, trueness) [6,16] характеризует степень соответствия между известным истинным значением или справочной величиной и значением, полученным по данной методике.

4. Прецизионность (precision) [6,16] аналитической методики выражает степень близости (или степень разброса) результатов для серии измерений, выполненных по данной методике на различных пробах одного и того же однородного образца. Прецизионность может рассматриваться на трех уровнях: сходимости, внутрилабораторная прецизионность и воспроизводимость.

Прецизионность необходимо изучать на достоверно однородных образцах. Однако если однородный образец получить невозможно, то можно использовать его раствор или модельные смеси.

Прецизионность аналитической методики обычно характеризуют дисперсией, стандартным отклонением или относительным стандартным отклонением для серии измерений.

4.1. Сходимость (repeatability) характеризует прецизионность методики при ее выполнении в одних и тех же условиях (в частности, одним и тем же аналитиком или группой аналитиков) в течение небольшого промежутка времени.

4.2. Внутрिलाбораторная прецизионность (*intermediate precision*) характеризует влияние внутрिलाбораторных вариаций: различные дни, различные аналитики, различное оборудование и т. д.

4.3. Воспроизводимость (*reproducibility*) характеризует прецизионность в межлабораторном эксперименте (совместные исследования, обычно применяемые для стандартизации метода).

5. Предел обнаружения (*detection limit*) для конкретной аналитической методики представляет собой минимальное количество анализируемого вещества в образце, которое может быть обнаружено (при этом не обязательно должно быть определено точное значение).

6. Предел количественного определения (*quantitation limit*) для аналитической методики представляет собой минимальное количество анализируемого вещества в образце, которое может быть количественно определено с требуемой правильностью и прецизионностью. Предел количественного определения является валидационной характеристикой методик количественного определения малых концентраций веществ в образце и рассматривается в основном при определении примесей и/или продуктов разложения.

7. Линейность (*linearity*) — это способность методики (в пределах диапазона применения) получать результаты испытаний, прямо пропорциональные концентрации (количеству) анализируемого вещества в образце.

8. Диапазоном применения (*range*) аналитической методики является интервал между минимальной и максимальной концентрациями (количествами) анализируемого вещества в образце (включая эти концентрации), для которого показано, что аналитическая методика имеет требуемую прецизионность, правильность и линейность.

9. Робастность (*robustness*) — это способность аналитической методики не подвергаться влиянию малых, задаваемых (контролируемых) аналитиком изменений в усло-

виях выполнения методики. Робастность является показателем надежности методики при ее использовании в указанных условиях.

В. ПРОВЕДЕНИЕ ВАЛИДАЦИИ АНАЛИТИЧЕСКИХ МЕТОДИК

Введение

Главной задачей валидации аналитической методики является экспериментальное доказательство того, что данная методика пригодна для достижения тех целей, для которых она предназначена. В отчет по валидации должны быть включены все данные, полученные в процессе валидации и использованные для расчетов формулы с соответствующим их обсуждением.

Подходы к проведению валидации методик анализа биологических и биотехнологических препаратов в некоторых случаях могут быть иными, чем указано в данном разделе.

При проведении валидации необходимо использовать только стандартные образцы с известными характеристиками, подтвержденными документально. Необходимая степень их чистоты зависит от задач, которые решаются при их использовании.

Последовательность рассмотрения валидационных характеристик отражает процесс, по которому может разрабатываться и оцениваться аналитическая методика. Однако целесообразно планировать эксперимент так, чтобы соответствующие валидационные характеристики изучались одновременно, обеспечивая правильное и полное понимание возможностей аналитической методики, например: специфичность, линейность, диапазон применения, правильность и прецизионность.

1. Специфичность

Исследование специфичности проводится при валидации испытаний на идентификацию, контроль примесей и количественное определение. Способ подтверждения специфичности зависит от задач, для решения которых предназначена аналитическая методика.

Если методика недостаточно специфична, применяют сочетание двух или более аналитических методик для достижения необходимого уровня избирательности.

1.1. Идентификация

Испытания на идентификацию должны обеспечивать возможность различать соединения близкого строения, которые могут присутствовать в образце совместно с определяемым компонентом. Избирательность методики может быть подтверждена получением положительных результатов (возможно, путем сравнения с известным стандартным образцом) для образцов, содержащих определяемый компонент, и отрицательных результатов, полученных для образцов, не содержащих его. Для подтверждения отсутствия ложноположительных результатов испытание на идентификацию может быть проверено для веществ, имеющих близкое строение или сопутствующих анализируемому веществу. Выбор веществ, потенциально мешающих проведению испытания, должен быть обоснован.

1.2. Количественное определение и испытания на примеси

При валидации хроматографических методик для подтверждения специфичности должны использоваться характерные хроматограммы с указанием индивидуальных веществ. Аналогичный подход используют и для других методов разделения.

Для хроматографических методик разрешение должно быть исследовано для соответствующих концентраций ве-

ществ. Для подтверждения специфичности может быть использовано разрешение двух наиболее близко элюирующихся веществ.

В случае использования неспецифичного метода количественного определения необходимо применять дополнительные аналитические методики и подтверждать специфичность всего комплекса методик. Например, если количественное определение действующего вещества при выпуске проводится титриметрическим методом, то его можно дополнить соответствующим испытанием на примеси.

Для количественного определения и для испытаний на примеси применяют одинаковые подходы, описанные ниже.

1.2.1. Образцы примесей имеются

Для метода количественного определения необходимо подтвердить избирательность определения анализируемого вещества в присутствии примесей и/или вспомогательных веществ. Это можно сделать внесением в образец (активную субстанцию или готовый лекарственный препарат) примесей и/или вспомогательных веществ в соответствующей концентрации и последующего доказательства того, что это не отразилось на получаемом результате (путем сравнения результатов, полученных на исходном и загрязненном образцах).

Для испытаний на чистоту подтверждение избирательности проводят путем загрязнения активной субстанции или готового лекарственного препарата соответствующими количествами примесей и доказательства разделения этих примесей как друг от друга, так и от других компонентов образца.

1.2.2. Образцы примесей отсутствуют

Если образцы примесей или продуктов разложения отсутствуют, подтверждение специфичности проводят путем

сравнения результатов анализа образцов, содержащих примеси или продукты разложения, полученных с помощью предлагаемой методики и другой арбитражной методики. В качестве последней может быть использована фармакопейная методика или другая валидированная методика. Этот подход предполагает предварительное загрязнение образца продуктами разложения путем выдерживания его в стрессовых условиях: воздействие света, тепла, влажности, гидролиз, окисление и т. п.

При валидации методики количественного определения следует сравнить результаты анализов, полученных с использованием валидируемой и арбитражной методик.

При валидации испытания на чистоту следует сравнить результаты определения примесей, полученные с использованием валидируемой и арбитражной методик.

Для доказательства того, что пик анализируемого вещества соответствует только одному компоненту, используют тесты на чистоту пиков, например с использованием диодно-матричного детектирования, масс-спектрометрии и др.

2. Линейность

Линейная зависимость должна быть исследована в пределах диапазона применения аналитической методики. Она может быть подтверждена непосредственно на активной субстанции (путем разбавления исходного раствора) и/или для лекарственных препаратов на модельных смесях с использованием соответствующей процедуры, что может быть исследовано при изучении диапазона применения.

По полученным данным строят график зависимости сигнала как функции концентрации или количества определяемого компонента и визуально оценивают его линей-

ность. Если линейная зависимость наблюдается, то результаты обрабатывают подходящим статистическим методом, например методом наименьших квадратов. В некоторых случаях для получения линейности данные следует подвергнуть предварительному математическому преобразованию. Должны быть определены и представлены: коэффициент корреляции, точка пересечения с осью ординат, тангенс угла наклона прямой и остаточная сумма квадратов отклонений, а также график со всеми экспериментальными данными. Для оценки линейности может потребоваться анализ отклонений экспериментальных данных от прямой.

Некоторые аналитические методики, например иммуноаналитические, не показывают линейности ни при каких математических преобразованиях. В таких случаях аналитический отклик должен быть описан подходящей функцией концентрации анализируемого вещества в образце.

Для подтверждения линейности рекомендуется использовать не менее 5 концентраций. Другие подходы должны быть обоснованы.

3. Диапазон применения

Диапазон применения методики зависит от ее назначения и определяется при изучении линейности. В пределах диапазона применения методика должна обеспечивать требуемую линейность, правильность и прецизионность.

Минимально допустимые диапазоны применения методик:

- для количественного определения активной субстанции или готового лекарственного препарата: как правило, от 80% до 120% от номинального содержания;

- для однородности дозирования: от 70% до 130% от номинального содержания, если для испытания не требуется более широкий интервал, обусловленный свойствами лекарственной формы (например, дозированные ингаляторы);
- для испытаний на растворение: $\pm 20\%$ (абсолютных) от нормируемой величины высвобождения. Например, если при контроле высвобождения пролонгированных лекарственных препаратов нормируемая величина высвобождения составляет от 20% за первый час и до 90% за 24 ч, то диапазон применения должен быть от 0% до 110% от номинального содержания;
- для определения примесей: от концентрации, в которой примесь обычно обнаруживается, до 120% от нормируемого содержания. Для примесей, обладающих чрезвычайно сильным действием или имеющих токсический или непредвиденный фармакологический эффект, предел детектирования / количественного определения должен соответствовать тому уровню концентрации, на котором эти примеси должны контролироваться.

Примечание. При проведении валидации испытания на примеси непосредственно в процессе разработки методики необходимо определить диапазон применения, внутри которого находится предполагаемый предел нормирования примесей.

Если количественное определение и испытание на примеси выполняются совместно как одно испытание и используется только стандарт основного вещества, соответствующий его номинальному содержанию, то диапазон применения должен охватывать диапазон концентрации от нормируемого содержания примеси до 120% от номинального содержания основного вещества.

4. Правильность

Правильность изучают в пределах диапазона применения аналитической методики.

4.1. Количественное определение

4.1.1. Активная субстанция

Могут использоваться следующие способы определения правильности:

а) применение аналитической методики к образцу с известной степенью чистоты, например к стандартному образцу;

б) сравнение результатов анализа, полученных с использованием валидируемой методики и арбитражного метода, правильность и прецизионность которого известны (использование независимого метода, см. п. 1.2.2.);

с) заключение о правильности можно сделать после того, как установлены прецизионность, линейность и специфичность.

4.1.2. Готовый лекарственный препарат

Могут использоваться следующие способы определения правильности:

а) применение методики к искусственным смесям, к которым были добавлены известные количества анализируемого вещества;

б) если невозможно получить образцы всех компонентов лекарственного препарата, возможно применение метода добавок или арбитражной методики, правильность которой доказана (см. п. 1.2.2.);

с) заключение о правильности можно сделать после того, как установлены прецизионность, линейность и специфичность.

4.2. Примеси (количественное содержание)

Правильность изучают на образцах (субстанции или готового лекарственного препарата) с добавленным известным количеством примесей.

Если примеси или продукты разложения недоступны, применяют арбитражный метод (см. п. 1.2.2.). Если примеси неизвестны, то чувствительность их определения может быть принята равной чувствительности определения субстанции. Если чувствительность определения субстанции и примеси существенно отличается, то вводят коэффициент пересчета.

Должен быть указан конкретный способ нормирования содержания отдельной примеси или суммы примесей, например, в массовых процентах, в процентах по отношению к площади пика основного анализируемого компонента или др.

4.3. Представление данных

Правильность оценивают не менее чем для девяти определений, охватывающих весь диапазон применения (например, три концентрации и три определения для каждой). Определения должны включать все стадии методики.

Правильность выражают в процентах найденного значения от введенного количества или как разность между средним и истинным значением с учетом соответствующих доверительных интервалов.

5. Прецизионность

Валидационная характеристика прецизионности изучается для методик количественного определения и методик количественного определения примесей.

5.1. Сходимость

Сходимость изучают, выполняя:

а) не менее девяти определений, охватывающих диапазон применения методики (например, три концентрации / три определения для каждой)

или

б) не менее шести определений для образцов с содержанием анализируемого вещества, близким к номинальному.

5.2. Внутрилабораторная прецизионность

Устанавливают влияние случайных факторов на прецизионность валидируемой аналитической методики. Типичными исследуемыми факторами являются различные дни, различные аналитики, различное оборудование и т. п. Не считается необходимым изучать влияние каждого фактора отдельно. При изучении влияния различных факторов предпочтительно использовать планирование эксперимента.

5.3. Воспроизводимость

Воспроизводимость оценивают путем проведения межлабораторных исследований. Воспроизводимость должна быть изучена при стандартизации аналитической методики, например при включении методики в фармакопею. Эти данные не включают в регистрационное досье.

5.4. Представление данных

При изучении прецизионности следует представлять: стандартное отклонение, относительное стандартное отклонение и доверительный интервал.

6. Предел обнаружения

В зависимости от того, является ли методика инструментальной или неинструментальной, возможны

различные подходы для определения предела обнаружения. Используются следующие (а также другие) подходы.

6.1. Визуальная оценка

Визуальную оценку используют как для неинструментальных, так и для инструментальных методов.

Предел обнаружения устанавливают путем анализа образцов с известными концентрациями анализируемого вещества и оценкой минимального содержания, при котором анализируемое вещество надежно определяется.

6.2. Соотношение сигнал/шум

Этот подход применим только к тем методам, для которых наблюдается шум базовой линии. Для определения соотношения сигнал/шум сравнивают величины сигналов, полученные для контрольного опыта и для образцов с низкими концентрациями анализируемого вещества. На основании полученных данных устанавливают минимальную концентрацию, для которой величина отношения сигнал/шум составляет обычно от 3 до 2.

6.3. Использование калибровочной прямой и стандартного отклонения аналитического сигнала

Предел обнаружения (ПО) может быть выражен как:

$$\text{ПО} = 3.3 \cdot \sigma / S, \quad (1)$$

где: σ — стандартное отклонение сигнала,

S — тангенс угла наклона калибровочной прямой.

Значение тангенса угла наклона калибровочной прямой вычисляют из калибровочной прямой для анализируемого вещества. Оценка стандартного отклонения сигнала σ может быть проведена многими способами, например следующими.

6.3.1. Использование стандартного отклонения сигнала для контрольного опыта

Измеряют величину аналитического сигнала для необходимого числа образцов, не содержащих анализируемого вещества, и вычисляют стандартное отклонение.

6.3.2. Использование калибровочной прямой

Получают калибровочную прямую для образцов с содержанием анализируемого вещества, близким к пределу обнаружения, и вычисляют ее параметры. В качестве стандартного отклонения σ в формуле (1) может быть использовано стандартное отклонение свободного члена линейной зависимости.

6.4. Представление данных

Представляют значение предела обнаружения с указанием способа, использованного для его определения. Если определение предела обнаружения основывается на отношении сигнал/шум, представляют соответствующие хроматограммы.

Если значение предела обнаружения получено путем вычислений или экстраполяции, его оценка должна быть подтверждена анализом необходимого числа образцов с содержанием анализируемого вещества, близким к пределу обнаружения.

7. Предел количественного определения

В зависимости от того, является ли методика инструментальной или неинструментальной, возможны несколько подходов для установления предела количественного определения. Могут быть использованы следующие (а также другие) подходы.

7.1. Визуальная оценка

Визуальную оценку используют как для неинструментальных, так и для инструментальных методов.

Предел количественного определения устанавливают путем анализа образцов с известными концентрациями анализируемого вещества и оценкой минимального содержания, при котором анализируемое вещество определяется количественно с требуемой правильностью и прецизионностью.

7.2. Соотношение сигнал/шум

Этот подход применим только к тем методам, для которых наблюдается шум базовой линии. Для определения соотношения сигнал/шум сравнивают величины сигналов, полученные для контрольного опыта (при отсутствии анализируемого вещества), и для образцов с низкими концентрациями анализируемого вещества. На основании полученных данных устанавливают минимальную концентрацию, для которой величина отношения сигнал/шум составляет около 10:1.

7.3. Использование калибровочной прямой и стандартного отклонения сигнала

Предел количественного определения (ПКО) может быть выражен как:

$$\text{ПКО} = 10 \cdot \sigma / S, \quad (2)$$

где: σ — стандартное отклонение сигнала,

S — тангенс угла наклона калибровочной прямой.

Значение тангенса угла наклона калибровочной прямой S может быть определено из калибровочной прямой для анализируемого вещества. Оценка стандартного отклонения сигнала σ может быть проведена многими способами, например следующими.

7.3.1. Использование стандартного отклонения сигнала для контрольного опыта

Измеряют величину аналитического сигнала для необходимого числа образцов, не содержащих анализируемое вещество, и вычисляют стандартное отклонение.

7.3.2. Использование калибровочной прямой

Получают калибровочную прямую для образцов с содержанием анализируемого вещества, близким к пределу количественного определения, и вычисляют ее параметры. В качестве стандартного отклонения σ в формуле (2) может быть использовано стандартное отклонение свободного члена линейной зависимости.

7.4. Представление данных

Представляют значение предела количественного определения с указанием способа, использованного для его определения. Значение предела количественного определения должно быть подтверждено анализом необходимого числа образцов с содержанием анализируемого вещества, близким к пределу количественного определения.

8. Робастность

Оценку робастности проводят на стадии разработки методики с учетом типа изучаемой методики. Эта оценка должна доказать надежность результатов анализа при небольших изменениях параметров методики.

Если на результаты анализа влияют условия его проведения, то эти условия должны быть стандартизированы и в текст методики вносят соответствующие предостережения.

Типичные примеры изучаемых параметров:

- устойчивость во времени аналитических растворов;
- время экстракции.

В случае жидкостной хроматографии:

- рН подвижной фазы;
- состав подвижной фазы;
- колонки (различные серии и/или поставщики);
- температура;
- скорость подвижной фазы.

В случае газовой хроматографии:

- колонки (различные серии и/или поставщики);
- температура;
- скорость газа-носителя.

9. Проверка пригодности системы

Проверка пригодности системы является составной частью многих аналитических методик. Этот тест основан на представлении о том, что оборудование, электроника, аналитические операции и анализируемые образцы составляют единую систему, которую можно оценивать как целое. Параметры, вводимые в тест «Проверка пригодности аналитической системы», зависят от используемого метода анализа и обосновываются исследованиями по робастности.

С. ВАЛИДАЦИЯ АНАЛИТИЧЕСКИХ МЕТОДИК: ОСОБЕННОСТИ ЕЕ ПРИМЕНЕНИЯ К МЕТОДАМ, ИСПОЛЬЗУЕМЫМ В ФАРМАКОПЕЕ

1. Оптическое вращение (2.2.7)¹

1.1. Введение

Выбирают растворитель, позволяющий получать максимально возможный угол вращения. Исследуют стабильность угла вращения испытуемого раствора в течение не менее 2 ч. При необходимости указывают, что раствор используют свежеприготовленным (сразу после приготовления). В необходимых случаях указывают время достижения стабильного значения угла вращения.

Там, где возможно, используют D-линию натрия.

1.2. Идентификация

Если испытуемое вещество представляет собой энантиомер, то для идентификации используют удельный показатель оптического вращения.

Если удельный показатель оптического вращения используют только для целей идентификации, то его значение можно не пересчитывать на сухое вещество. Регламентируемые пределы величины удельного показателя должны учитывать допустимые пределы количественного содержания анализируемого вещества и чистоту образцов различного происхождения, которые выдерживают требования соответствующей монографии.

Если удельный показатель оптического вращения используется также и для контроля чистоты энантиомеров, то испытание раздела «Идентификация» может содержать

¹Здесь и далее по тексту цифры в скобках обозначают номер статьи Европейской Фармакопеи, в которой описан данный метод анализа: European Pharmacopoeia. — 2.2.7. Optical Rotation. Рекомендуется пользоваться соответствующими статьями Европейской Фармакопеи до введения аналогичных гармонизированных статей в Государственную Фармакопею РФ.

ссылку: выдерживает требования испытания «Удельное оптическое вращение».

1.3. Испытания

Удельный показатель оптического вращения (в отдельных случаях угол вращения) может быть использован для подтверждения оптической чистоты энантиомера. Этот метод менее чувствителен, чем метод хиральной жидкостной хроматографии (ЖХ). Если измерение удельного оптического вращения предназначено для того, чтобы нормировать содержание одного из энантиомеров, необходимо показать, что в условиях методики анализируемый энантиомер имеет достаточную величину оптического вращения, чтобы быть обнаруженным. Результат определения представляют в пересчете на сухое вещество. Если возможно, представляют данные о влиянии потенциальных примесей. Пределы удельного показателя оптического вращения устанавливают с учетом возможного содержания примесей. При отсутствии информации об оптическом вращении примесей обычно устанавливают пределы отклонения $\pm 5\%$ от среднего значения, полученного на образцах, отвечающих всем остальным требованиям частной статьи. Если возможно, исследуют образцы различного происхождения. Полезно также исследовать образцы в конце срока хранения.

В некоторых случаях измерение оптического вращения может использоваться для подтверждения того, что субстанция является рацематом. В таких случаях обычно устанавливают пределы от -0.10° до $+0.10^\circ$.

Если возможно, должно быть продемонстрировано, что в условиях испытания энантиомер имеет оптическую активность, которая позволяет корректно его определять.

Угол вращения может быть использован для подтверждения оптической чистоты энантиомера, например такого,

как метилдиоксифенилаланин, к которому прибавляют $AlCl_3$, что увеличивает угол вращения за счет образования комплекса.

1.4. Количественное определение

Оптическое вращение может быть использовано для количественного определения субстанции, например этамбутола гидрохлорида. При этом необходимо использовать стандартный образец с известной оптической чистотой.

2. Абсорбционная спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях спектра (2.2.25)¹

Должна быть доказана пригодность выбранных условий определения, таких, как используемые растворители и их качество, pH раствора и т. д.

Обычно ультрафиолетовая спектрофотометрия имеет ограниченную специфичность, которую можно повысить использованием первой и второй производной спектра.

2.1. Идентификация

Ультрафиолетовая спектрофотометрия сама по себе редко используется для идентификации. Когда этот метод включают в набор испытаний для идентификации, необходимо изучить его специфичность путем сравнения спектров анализируемого вещества со спектрами подобных соединений. Специфичность метода можно повысить, если использовать не абсолютные значения оптических плотностей, а спектральные отношения.

¹European Pharmacopoeia. — 2.2.25. Absorption Spectrophotometry, Ultraviolet and Visible.

2.2. Испытания на допустимые пределы содержания примесей

Если ультрафиолетовая спектрофотометрия используется в испытаниях на допустимые пределы содержания примесей, следует показать, что анализируемые примеси дают достаточный вклад в измеряемую оптическую плотность. При выбранной длине волны должна быть установлена оптическая плотность, соответствующая нормируемой концентрации анализируемой примеси.

2.3. Количественное определение

Если ультрафиолетовая спектрофотометрия используется для количественного определения, то следует оценить влияние примесей на светопоглощение. При количественном определении не рекомендуется использовать удельный показатель поглощения. Если удельный показатель поглощения все же применяется, то его значение следует устанавливать на основании межлабораторного исследования, используя серии с известной чистотой. Чистота этих образцов должна оцениваться с использованием различных методов, включающих как методы разделения, так и абсолютные методы (не требующие использования стандартного образца).

3. Неинструментальные испытания на чистоту и допустимые пределы содержания примесей

3.1. Внешний вид раствора (2.2.1¹ и 2.2.2²)

Это визуальные испытания, предназначенные для оценки общей чистоты субстанции и основанные на сравнении окраски (или опалесценции) испытуемого раство-

¹ European Pharmacopoeia. — 2.2.1. Clarity and Degree of Opalescence of Liquids.

² European Pharmacopoeia. — 2.2.2. Degree of Coloration of Liquids.

ра и серии эталонов. Часто неизвестно, какие примеси и в какой концентрации обуславливают окраску или опалесценцию. В этом случае валидация основывается на сопоставлении данных, полученных для разных серий, представленных производителем (или производителями). Если примеси известны и доступны, валидацию этого метода проводят путем сравнения с более совершенным методом.

3.2. Кислотность и щелочность

Это неспецифичное испытание является одной из характеристик чистоты препарата и используется для контроля протолитических примесей.

3.2.1. Выбор показателя «рН» или «Кислотность/щелочность» для контроля качества субстанций

Для контроля протолитических примесей в субстанциях используют два испытания:

1) полуколичественное титрование с использованием индикаторного или потенциметрического определения конечной точки титрования — испытание «Кислотность/щелочность»;

2) измерение рН.

Если вещество имеет буферные свойства, то предпочтительным является измерение рН. В другом случае рекомендуется титриметрическая процедура. Испытание кислотность/щелочность применяется также в том случае, если исследуемая субстанция не гидролизует или нерастворима в воде.

Вопрос выбора теста «Кислотность/щелочность» или «рН» при разработке нормативного документа или монографии на субстанцию может быть решен на основе оценки буферных свойств самой субстанции.

Для оценки буферных свойств строят кривую потенциметрического титрования водного раствора (или в случае нерастворимых в воде веществ — экстракта (водной вы-

тяжки) необходимой концентрации (от 10 г/л до 50 г/л), используя в качестве титранта *0.01 М раствор кислоты хлористоводородной* или *0.01 М раствор натрия гидроксида*, соответственно. Точка пересечения на кривых титрования есть истинный рН раствора и для чистой субстанции будет находиться на пересечении с осью рН. Степенью буферной емкости исследуемого раствора есть величина суммарного сдвига рН (ΔpH), рассчитанная из кривой титрования в результате прибавления к 10 мл испытуемого раствора 0.25 мл 0.01 М раствора натрия гидроксида, а потом к другим 10 мл такого же раствора 0.25 мл *0.01 М раствора кислоты хлористоводородной*. Чем больше величина ΔpH , тем меньше буферная емкость раствора.

Величина ΔpH испытуемого раствора определяет выбор метода для регламентации протолитических примесей соответственно схеме, приведенной в табл. 2. Классификация субстанций базируется на том факте, что для большинства индикаторов переход окраски происходит в границах 2 единиц рН.

Таблица 2

Классификация субстанций по величине ΔpH

Класс буферности	ΔpH	Название испытания, которое применяется
Класс А	$\Delta\text{pH} > 4$	Испытание «Кислотность/щелочность» с двумя соответствующими индикаторами.
Класс В	$4 > \Delta\text{pH} > 2$	Испытание «Кислотность/щелочность» с одним соответствующим индикатором.
Класс С	$2 > \Delta\text{pH} > 0.2$	Прямое измерение рН.
Класс D	$\Delta\text{pH} < 0.2$	Протолитические примеси невозможно удовлетворительно контролировать. К таким субстанциям принадлежат вещества, которые являются солями и состоят из ионов с более чем одной кислотной и/или основной функциональными группами. Для них измерение рН может способствовать обеспечению заявленного состава субстанции, если границы рН являются достаточно узкими.

Изменением концентрации испытуемого раствора можно изменять класс буферности, в который попадает исследуемая субстанция, в соответствии со схемой, приведенной в табл. 2. При этом будет изменяться и форма кривой титрования. По возможности не следует выходить за пределы указанных выше концентраций. Однако, если вещество очень мало растворимо в воде, возможно использование и более разбавленных растворов, чем с концентрацией 10–50 г/л.

В некоторых случаях испытание кислотность/щелочность невозможно провести с помощью индикатора или по причине окраски самого вещества, или по причине разложения самого вещества. В таких случаях тест проводится электрометрически (потенциометрически). Если добавление кислоты или основания способствует разрушению молекулы субстанции или выпадению осадка, необходимо, не считаясь с буферными свойствами, отказаться от проведения испытания «Кислотность/щелочность» в пользу измерения рН.

Растворы готовят с использованием *воды, свободной от углерода диоксида*¹.

3.3. Испытания на допустимые пределы содержания анионов и катионов (2.4)²

Пригодность этих испытаний следует доказать путем использования метода добавок и/или сравнения с другими, более совершенными методами.

Сульфатная зола (2.4.14)³. Это испытание предназначено для определения суммы катионов металлов, присутствующих в органических субстанциях, но не пригодно для неорганических солей органических соединений. Обычно предел не должен превышать 0.1%. Этот метод не требует валидации.

¹ European Pharmacopoeia. — 4.1.1. Reagents.

² European Pharmacopoeia. — 2.4. Limit Tests.

³ European Pharmacopoeia. — 2.4.14. Sulphated Ash.

Тяжелые металлы (2.4.8)¹. Применяют различные способы проведения этого испытания. Обычно предел содержания тяжелых металлов составляет 0.001% (10 ppm) или 0.002% (20 ppm), но иногда и 0.0005% (5 ppm), что находится вблизи предела обнаружения.

Для валидации испытания на тяжелые металлы анализируют испытуемый образец и образец, специально загрязненный свинцом в соответствующей концентрации. Окраска испытуемого образца должна быть менее интенсивной, а загрязненного образца — такой же, как окраска эталона, или более интенсивной.

Для ряда методик, требующих сжигания образца, существует опасность потерь некоторых тяжелых металлов (например, таких, как ртуть и свинец в присутствии хлоридов). В таких случаях, если возможно, контролируют содержание тяжелых металлов методом атомно-абсорбционной спектроскопии или другим инструментальным методом.

Если известно, что при синтезе субстанции используется катализатор, например палладий, никель или родий, то их содержание целесообразно контролировать колориметрическими или инструментальными методами (например, атомно-абсорбционная спектроскопия и др.)

Цветные реакции или реакции осаждения. Для отдельных катионов и анионов описаны предельные испытания, основанные на визуальном сравнении окраски или опалесценции. При этом необходимо доказать, что:

- окраска, или опалесценция, для нормируемых концентраций отчетливо видна;
- найденная концентрация добавленного иона одинакова как для испытуемого раствора, так и для раствора сравнения (как визуально, так и с помощью методов, основанных на измерении поглощения);
- значения оптической плотности растворов, содержащих 50%, 100% и 150% анализируемой примеси от

¹ European Pharmacopoeia. — 2.4.8. Heavy Metals.

нормируемой концентрации, должны значительно различаться;

- определение примеси на уровне нормируемой концентрации проводят не менее 6 раз и вычисляют стандартное отклонение. Найденная концентрация должна составлять не менее 80% от введенной, а относительное стандартное отклонение — не более 20%.

Целесообразно провести сравнение результатов предельного испытания с результатами количественного определения с использованием независимого метода, например атомно-абсорбционной спектроскопии для катионов или ионной хроматографии для анионов. Результаты, полученные двумя методами, должны быть близки.

4. Атомно-абсорбционная спектроскопия (2.2.23)¹

Метод атомно-абсорбционной спектроскопии (ААС) применяют для испытаний по определению содержания отдельных элементов, присутствующих в образце.

4.1. Специфичность

Специфичность данного метода определяется тем, что атомы анализируемого элемента поглощают характеристическое излучение от источника со строго дискретными длинами волн, соответствующими данному элементу. Однако возможны помехи вследствие как оптических, так и химических эффектов. Перед началом валидации необходимо выявить помехи такого рода и, если возможно, снизить их влияние путем использования соответствующих приемов.

Эти помехи могут привести к систематической погрешности при использовании метода прямой калибровки или к изменению чувствительности метода. Основным источником

¹ European Pharmacopoeia. — 2.2.23. Atomic Absorption Spectrometry.

погрешности в методе ААС являются погрешности, связанные с процессом калибровки и мешающим влиянием матрицы.

4.2. Калибровка

Использование линейной модели калибровки описано в общей статье Европейской Фармакопеи 2.2.23 «Atomic Absorption Spectrometry» (2.2.23 «Атомно-абсорбционная спектрометрия»). Для доказательства применимости линейной регрессионной модели рекомендуется использовать не менее 4 калибровочных растворов. В некоторых случаях возможно использование параболической модели калибровки. При этом также используют не менее 4 калибровочных растворов. Рекомендуется использовать концентрации калибровочных растворов с равномерным распределением внутри диапазона применения.

Для каждой концентрации рекомендуется выполнять не менее 5 измерений.

Проблемы с калибровкой часто могут быть выявлены визуально. Однако калибровочные графики сами по себе нельзя использовать как доказательство пригодности метода калибровки. Калибровочный график представляют в следующем виде:

а) на графике откладывают измеренные оптические плотности как функции концентраций и строят кривую, описывающую эту калибровочную функцию, вместе с ее доверительными интервалами. Экспериментальные точки должны находиться в пределах доверительного интервала построенной кривой.

б) на графике откладывают остаточные отклонения (разности между измеренными и вычисленными по калибровочному графику оптическими плотностями) как функции концентрации. Эти разности должны распределяться вокруг оси абсцисс случайным образом.

В некоторых случаях разброс значений сигнала возрастает с ростом концентрации, что может быть выявлено из

графика остаточных отклонений или статистическими методами. При этом наибольшая прецизионность может быть достигнута при использовании калибровки с весовыми множителями. Может быть применена как линейная, так и квадратичная весовая функция.

В случае использования весовой модели строят график взвешенных разностей (т. е. разностей, умноженных на массы) как функции концентрации следующим образом:

а) на графике откладывают измеренные оптические плотности как взвешенные функции концентраций и строят кривую, описывающую эту калибровочную функцию вместе с ее доверительными интервалами;

б) на графике откладывают взвешенные остаточные отклонения (т. е. взвешенные разности между измеренными и вычисленными по калибровочному графику оптическими плотностями) как функции концентрации.

Необходимо показать, что модель достаточно точно описывает экспериментальные данные.

4.3. Эффекты матрицы

Если для получения калибровочной функции используют метод калибровочной кривой, то необходимо показать, что чувствительность для раствора анализируемого образца и калибровочных растворов одинакова.

Если применяется калибровка в виде прямой линии, различия в чувствительности могут быть обнаружены путем сравнения наклонов калибровочной прямой, полученной с использованием эталонных растворов и растворов, полученных внесением стандартной добавки к испытуемому раствору. Прецизионность оценки наклонов обеих прямых зависит от числа и распределения точек измерения. Поэтому для построения обеих регрессионных линий рекомендуется использовать достаточное число точек (не менее 5) и выбирать концен-

трации преимущественно на границах диапазона калибровки.

Обоснованием для возможности использования метода калибровочной кривой является незначимость различий наклонов полученных прямых, по критерию Стьюдента. Если различия значимы, то используют метод стандартных добавок.

4.4. Предел обнаружения и предел количественного определения (основанный на стандартном отклонении контрольного опыта — см. раздел В, п. 6.3.1 и п. 7.3.1)

Выполняют контрольные опыты, для которых предпочтительно использовать растворы «плацебо», содержащие все компоненты образца, за исключением определяемого. Если такие контрольные опыты выполнить невозможно, то допустимо использовать холостые растворы, содержащие все реагенты и приготовленные так же, как и испытуемый раствор.

5. Методы разделения

5.1. Хроматографические методы

Различные хроматографические методы: тонкослойная хроматография (ТСХ), газовая хроматография (ГХ), жидкостная хроматография (ЖХ), — могут использоваться для идентификации, контроля примесей и количественного определения. Ниже описаны особенности валидации данных методов.

5.1.1. Тонкослойная хроматография (2.2.27)¹

Специфичность. Для тестов идентификации обычно нельзя добиться специфичности, используя только тонкослойную хроматографию саму по себе, однако достаточ-

¹ European Pharmacopoeia. — 2.2.27. Thin-Layer Chromatography.

ная избирательность может быть достигнута при сочетании ТСХ с другими методами. Если для предельного испытания избирательность недостаточна, то используют дополнительное испытание (испытания), для контроля примеси (примесей), зона которой не была отделена от других зон. Необходимо доказать избирательность совокупности используемых методик. Для испытаний идентификации улучшение избирательности может быть достигнуто при использовании опрыскивания реактивом, который позволяет различать близкие соединения по цвету.

Стационарная фаза. Необходимо показать, что данное испытание пригодно для проведения анализа на пластинках одного типа, но различного происхождения.

Тест «Проверка пригодности хроматографической системы». Такой тест обычно проводится для подтверждения разделения двух близко элюирующихся соединений, одним из которых является анализируемое вещество. Необходимо доказать, что разделение выбранных соединений гарантирует пригодность системы для достижения поставленных целей.

Для испытаний на содержание примесей необходимо учитывать следующее:

Обнаружение. Следует избегать использования особых опрыскивающих реагентов, если в методике не используется стандарт нормируемой примеси.

Предел обнаружения. Если применяют количественную инструментальную методику, для определения предела обнаружения используют подходы, описанные в пункте 6 раздела В. Если применяют визуальную методику, то необходимо показать, что обнаруживается количество, соответствующее указываемому пределу обнаружения.

Коэффициент пересчета. Если примеси доступны, то необходимо показать, что чувствительности определения примеси и основного вещества близки. Для испытаний на допустимые пределы примесей различия в чувствительно-

стях могут быть показаны путем сравнения пределов обнаружения.

Предел количественного определения, линейность, диапазон и сходимость. Эти данные необходимо представлять при использовании инструментальной количественной ТСХ.

5.1.2. Жидкостная хроматография (2.2.29)¹

Идентификация

- Специфичность

Для испытаний идентификации обычно нельзя добиться специфичности, используя только жидкостную хроматографию саму по себе, однако достаточная избирательность может быть достигнута при сочетании жидкостной хроматографии с другими методами. Избирательность должна быть показана для времен удерживания, относительных времен удерживания или для коэффициентов емкости для анализируемого вещества и близких по строению веществ. Эти данные необходимо представлять для нескольких стационарных фаз одного типа².

Испытания на предельное содержание примесей

- Специфичность

Избирательность разделения. Должно быть показано разделение известных и возможных примесей с основным веществом и, если возможно, между собой. Специфичность может быть подтверждена при использовании для детектирования масс-спектрометра. Примеси, которые не отделяются от основного вещества, должны контролироваться другим методом. Необходимо представлять данные о времени удерживания, относительном времени удерживания или коэффициенте емкости для основного вещества

¹ European Pharmacopoeia. — 2.2.29. Liquid Chromatography.

² При валидации методики может использоваться только одна коммерческая неподвижная фаза. В этом случае при валидации используют не менее 2 колонок с данной фазой, и в нормативной документации дают ссылку только на данную коммерческую фазу.

и примесей. Эти данные должны предоставляться для нескольких стационарных фаз одного типа 2.

Избирательность детектирующей системы. Выбор детектора и условий детектирования должен быть обоснован. Специфичность может быть подтверждена, например, при использовании для детектирования масс-спектрометра.

- Коэффициент пересчета

Если примеси доступны, то необходимо показать, что факторы отклика примеси и основного вещества близки (при использовании УФ-детектирования — при выбранной длине волны детектирования; это необходимо показать и для других типов детекторов — например, рефрактометрического или кондуктометрического). Если отношение чувствительностей известной примеси и основного вещества выходит за пределы 0.8–1.2 и если допустимый предел содержания этой примеси больше 0.1%, то необходимо использовать коэффициент пересчета либо стандарт нормируемой примеси в варианте внешнего стандарта.

- Предел обнаружения или количественного определения

Эти пределы следует определять для метода внешнего стандарта при использовании разведений испытуемой субстанции или при использовании стандарта примеси. Если пик примеси выходит в непосредственной близости от пика субстанции (особенно если непосредственно за ним), то предел обнаружения или количественного определения необходимо устанавливать по этой примеси. Метод, описанный в пункте 6 раздела В, пригоден для вычисления обоих указанных пределов.

- Стабильность (устойчивость)

Необходимо представлять данные, подтверждающие срок годности испытуемого раствора и раствора сравнения. Также следует представлять данные о стабильности подвижной фазы.

- Степень извлечения

При использовании экстракции необходимо изучить степень извлечения известных и доступных примесей при оптимальных условиях. Необходимо представить данные, подтверждающие, что экстракция обеспечивает достаточную прецизионность.

- Получение производных

Если используют пред- или послеклоночное получение производных, необходимо установить оптимальные условия реакции (время, температура и др.) и исследовать стабильность полученных производных.

- Тест «Проверка пригодности хроматографической системы»

Как описано для ТСХ. Использование соотношения сигнал/шум требуется только тогда, когда предел обнаружения и нормируемый предел содержания примеси близки.

Количественное определение

- Специфичность

Это желательное, но не основное требование. Если метод не специфичен, то возможность его использования обеспечивается низким уровнем содержания примесей, которые контролируют с помощью другого испытания.

- Тест «Проверка пригодности хроматографической системы»

Как описано для ТСХ.

5.1.3. Газовая хроматография (2.2.28)¹

Идентификация

- Специфичность

Как описано для жидкостной хроматографии.

Испытания на предельное содержание примесей

- Специфичность

Как описано для жидкостной хроматографии.

¹ European Pharmacopoeia. — 2.2.28. Gas Chromatography.

- Коэффициент пересчета

Как описано для жидкостной хроматографии. Следует предоставить коэффициенты пересчета нормируемой примеси относительно основного вещества. Это особенно важно при использовании селективных детекторов, таких, как детектор по электронному захвату и т. п.

- Пределы обнаружения и количественного определения

Как описано для жидкостной хроматографии.

- Стабильность

Как описано для жидкостной хроматографии.

- Получение производных

Как описано для жидкостной хроматографии.

- Внутренний стандарт

Необходимо показать, что при выбранных условиях пик внутреннего стандарта не перекрывается с пиками возможных примесей или основного вещества.

- Степень извлечения

Как описано для жидкостной хроматографии.

- Тест «Проверка пригодности хроматографической системы»

Ниже приводятся некоторые особенности, которые необходимо учитывать для данного теста.

- Соотношение сигнал/шум

Обычно определяют для сигналов, равных или несколько больших, чем предел обнаружения и предел количественного определения.

- Разрешение

Определяют для пика анализируемого вещества и ближайшего пика примеси или для пика анализируемого вещества и пика внутреннего стандарта. Если коэффициент асимметрии отличается от принятого диапазона (0.8–1.2), целесообразно нормировать его пределы (2.2.28)¹. Это особенно важно для тех случаев, когда используются набивные колонки или пик нормируемой примеси элюируется

непосредственно за пиком основного вещества. Если возможно, подтверждают выполнение испытания с использованием колонок подобного типа.

- Метод анализа равновесной паровой фазы

Этот метод применяют для анализа легколетучих веществ. Необходимо показать, что выбранные температура и время предварительного нагрева сосудов с анализируемым образцом обеспечивают установление равновесия. Следует изучить влияние матрицы. Эффекты влияния матрицы можно устранить при использовании метода стандартных добавок.

Количественное определение

- Специфичность

Как описано для жидкостной хроматографии.

- Тест «Проверка пригодности хроматографической системы»

Как описано для жидкостной хроматографии.

6. Определение воды полумикрометодом (2.5.12)¹

Для подтверждения корректности использования йодсернистых реактивов, которые отличаются по составу от йодсернистого реактива² (например, реактив Карла Фишера), следует провести валидацию одним из нижеприведенных методов.

6.1. Метод добавок

Определяют содержание воды (m_{H_2O} , мг) в субстанции соответственно методике, указанной в частной статье. Определения проводят не менее пяти раз. Потом к испытуемому образцу добавляют, предотвращая влияние атмосферной влаги, подходящий объем стандартизированного

¹ European Pharmacopoeia. — 2.5.12. Water: Semi-micro Determination.

² European Pharmacopoeia. — 4.1.1. Reagents.

раствора воды в метаноле² и определяют содержание воды (m_i , мг). Определения проводят не менее пяти раз для разных объемов стандартизированного раствора в приемлемом диапазоне применения методики.

Методом наименьших квадратов рассчитывают параметры линейной зависимости найденного содержания воды от количества прибавленной воды: тангенс угла наклона (b), точку пересечения с осью ординат (a) и точку пересечения экстраполированной калибровочной прямой с осью абсцисс (d).

Значение тангенса угла наклона b должно находиться в пределах от 0.975 до 1.025 ($\pm 2.5\%$). Относительные погрешности e_1 и e_2 , в процентах, вычисляют по формулам:

$$e_1 = \frac{a - m_{H_2O}}{m_{H_2O}} \cdot 100,$$

$$e_2 = \frac{d - m_{H_2O}}{m_{H_2O}} \cdot 100,$$

где: e_1 и e_2 не должны превышать $\pm 2.5\%$.

Для каждого из определений рассчитывают найденное количество в процентах от прибавленного количества. Среднее значение для пяти определений должно составлять от 97.5% до 102.5%.

6.2. Сравнение с арбитражным методом

Определяют содержание воды полумикрометодом и другим подходящим валидированным методом, например, методом газовой хроматографии (2.2.28)¹, методом термogravиметрического анализа (2.2.34)² и др.

Средние значения, полученные полумикрометодом и арбитражным методом, не должны отличаться статистически значимо.

¹ European Pharmacopoeia. — 2.2.28. Gas Chromatography.

² European Pharmacopoeia. — 2.2.34. Thermal Analysis.

D. РЕКОМЕНДАЦИИ ОТНОСИТЕЛЬНО КРИТЕРИЕВ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ВАЛИДАЦИИ ДЛЯ МЕТОДИК КОЛИЧЕСТВЕННОГО АНАЛИЗА [8,11,12,13]

При валидации методик рекомендуется использовать следующие подходы и критерии¹.

1. Требования к неопределенности результатов анализа

Полная неопределенность результата анализа (Δ_{As}), в процентах, выраженная как односторонний относительный доверительный интервал для уровня доверительной вероятности 95% [17], не должна превышать следующих величин (табл. 3):

Таблица 3

Испытания	Требования
Количественное определение: Субстанции [8]	$\Delta_{As} \leq BH - 100\%$
Другие субстанции и готовые лекарственные препараты	$\Delta_{As} \leq \frac{B_H - B_L}{2} \cdot 0.32$
Однородность содержания, растворение [11]	$\Delta_{As} \leq 3\%$
Сопутствующие примеси [12]	Предельные тесты: $\Delta_{imp} \leq 16\%$ Количественные тесты: $\Delta_{imp} \leq 5\%$
Остаточные органические растворители [13]	$\Delta_{imp} \leq 5\%$
Примечание: B_H — верхний предел содержания по спецификации, в процентах; B_L — нижний предел содержания по спецификации, в процентах.	

Рекомендуется также проводить прогноз неопределенности результата анализа (для оценки корректности методики при выполнении анализа в другой лаборатории) (Приложение 1).

¹ При проведении валидации могут использоваться другие научно обоснованные критерии.

Обычно полную неопределенность результатов анализа Δ_{As} можно разбить на составляющие, связанные с погрешностью пробоподготовки (Δ_{SP}) и с погрешностью конечной аналитической операции (Δ_{FAO}).

При прогнозе Δ_{SP} исходят из следующих требований к предельно допустимым погрешностям для мерной посуды, весов и приборов (табл. 4).

Таблица 4 [7]

Весы		
Неопределенность взвешивания		0.2 мг
Мерные колбы		
Объем колбы, мл	Неопределенность, %	
10	0.5	
25	0.23	
50	0.17	
100	0.12	
250	0.08	
500	0.07	
1000	0.05	
Пипетки		
Объем пипетки, мл	Неопределенность	
	мл	% (для всего объема)
0.5	0.005	1
1	0.006	0.6
2	0.01	0.5
5	0.03	0.6
10	0.05	0.5
25	0.1	0.4

Прогнозируемая неопределенность конечной аналитической операции (Δ_{FAO}) для хроматографических методик может быть рассчитана из требований к относительному стандартному отклонению в испытании на пригодность хроматографической системы (RSD_{max}) и используемого числа хроматограмм в методике. Для спектрофотометрических методик при прогнозе неопределенности конечной аналитической операции рекомендуется исходить из отно-

сительного стандартного отклонения оптической плотности с рандомизацией положения кювет, полученного в межлабораторном эксперименте (0.52%), и числа параллельных измерений (рекомендуется при выполнении анализа и при оценке неопределенности принимать, что число измерений должно быть не менее 3).

Рекомендуется, чтобы при разработке методик прогнозируемая неопределенность пробоподготовки была незначима, т. е. выполнялось соотношение:

$$\Delta_{SP} \leq 0,32 \cdot \Delta_{As}$$

Данное соотношение не всегда может быть выполнимо. Так, в случае обычной спектрофотометрии в варианте метода стандарта основным источником неопределенности результатов является, как правило, пробоподготовка. Однако для хроматографических методик предполагается, что обычно основным источником неопределенности является конечная аналитическая операция. Если неопределенность (прогнозируемая или изученная экспериментально), связанная с пробоподготовкой, является значимой, то к неопределенности конечной аналитической операции (т. е. к RSD_{\max} в испытании на пригодность хроматографической системы) следует предъявлять, соответственно, более жесткие требования, чтобы обеспечить выполнение критериев для полной неопределенности результата анализа.

2. Валидационные характеристики: рекомендации по проведению эксперимента и критериям приемлемости [10]

2.1. Критерий незначимости

Рекомендуемый подход основывается на систематическом применении принципа незначимости. Доверительный интервал Δ_2 является значимым на уровне $p = 5\%$ (незначимым на уровне $100 - p\% = 95\%$) по сравнению с дове-

рительным интервалом Δ_1 , если суммарный доверительный интервал превышает Δ_1 не более чем на $p\%$, т. е. выполняется неравенство:

$$\Delta_2 \leq 0,32 \cdot \Delta_1$$

2.2. Нормализованные координаты

Все дальнейшие рекомендации даны для метода стандарта, который является основным в фармацевтическом анализе.

Концентрации и аналитические сигналы (высота или площадь пика, оптическая плотность и т. д.) различных веществ могут находиться в самых разных цифровых диапазонах, что требует расчета критериев для каждого конкретного случая и лишает их общности и наглядности (например, представление прямой линии в реальных концентрациях и площадях пиков). Рекомендуется проводить расчеты в «нормализованных» координатах, что позволяет сформулировать единые критерии, связанные только с допусками содержания, но не зависящие от специфики конкретных веществ.

Пусть C_i — концентрация анализируемого вещества в i -ом анализируемом растворе (или образце), C^{st} — концентрация этого же вещества в растворе сравнения (предполагается, что она очень близка к номинальной концентрации). Аналогично: A_i — аналитический сигнал анализируемого вещества для i -ого анализируемого раствора, A^{st} — аналитический сигнал этого же вещества для раствора сравнения. Нормализованные координаты X_i и Y_i определяются следующим образом:

$$X_i = \frac{C_i}{C^{st}} \cdot 100\%, \quad Y_i = \frac{A_i}{A^{st}} \cdot 100\%$$

В дальнейшем все расчеты и критерии приводятся для нормализованных величин X_i и Y_i .

2.3. Линейность, правильность и прецизионность

Рекомендуется одновременно проводить изучение линейности, правильности и прецизионности. Для этого для количественных испытаний должно быть изучено не менее 9 точек в пределах изучаемого диапазона методики. Для оценки правильности и прецизионности используют все результаты, полученные при изучении линейности. Для оценки правильности и прецизионности используют отношение «найдено : введено», в процентах, (Z_i):

$$Z_i = \frac{Y_i}{X_i} \cdot 100\%.$$

2.3.1. Линейность

Для модельных растворов методом наименьших квадратов рассчитывают линейную зависимость:

$$(A_i / A_{st}) \cdot 100 = b (C_i / C_{st}) \cdot 100 + a,$$
$$Y_i = b X_i + a,$$

где a — свободный член для рассчитанной регрессионной прямой (отрезок, отсекаемый на оси ординат);
 b — угол наклона для рассчитанной регрессионной прямой.

2.3.1.1. Требования к свободному члену (a)

Критерий статистической незначимости. Свободный член a статистически незначимо отличается от нуля, если он не превышает свой доверительный интервал (Δ_A):

$$|a| \leq \Delta_A = t(95\%, n-2) \cdot s_a,$$

где s_a — стандартное отклонение для отрезка, который отсекается на оси ординат (для рассчитанной регрессионной прямой);

t — коэффициент Стьюдента для одностороннего распределения, доверительной вероятности 95% и числа степеней свободы $f = n - 2$.

Критерий практической незначимости. Если первый критерий не выполняется, используют критерий практической незначимости для свободного члена. Вклад свобод-

ного члена в неопределенность результата анализа должен быть незначимым в сравнении с максимально допустимой неопределенностью результата анализа. Поскольку максимальная погрешность вносится на границе диапазона, в котором методика должна давать корректные результаты, к свободному члену предъявляют следующие требования:

$$|a| \leq \frac{0.32 \cdot \Delta_{As} (\%)}{1 - (C_{\min} / 100)},$$

где C_{\min} — минимальная концентрация для диапазона, в котором валидируется методика анализа.

2.3.1.2. Требования к остаточному стандартному отклонению (S_0)

Доверительный интервал разброса точек вокруг прямой равняется произведению коэффициента Стьюдента на остаточное стандартное отклонение S_0 . Односторонний доверительный интервал не должен превышать предельно допустимую неопределенность методики анализа Δ_{As} (число степеней свободы точек прямой равно $f = n - 2$):

$$S_0 / b \leq \frac{\Delta_{As}}{t(95\%, n-2)} \%,$$

где b — угол наклона для рассчитанной регрессионной прямой.

2.3.1.3. Требования к коэффициенту корреляции (r)

Концентрации, которые исследуются при изучении линейности, характеризуются стандартным отклонением RSD_y (%), которое рассчитывают по формуле:

$$RSD_y = \sqrt{\frac{\sum (C_i - \bar{C})^2}{\bar{C}^2 \cdot (g-1)}} \cdot 100\%,$$

где C_i — концентрация i -ого раствора;
 \bar{C} — средняя концентрация растворов;
 g — объем выборки (число точек прямой).

При получении критериев для коэффициента корреляции удобно использовать выражение для общего индекса корреляции R_c , частным случаем которого является и коэффициент линейной корреляции r :

$$R_c = r = \sqrt{1 - \frac{S_0^2}{RSD_y^2}},$$

Поскольку в нормализованной системе координат значение « b » близко к единице, принимают, что $S_0/b \approx S_0$. Исходя из требований к S_0 , для коэффициента корреляции должны выполняться следующие требования:

$$r \geq \sqrt{1 - \left(\frac{\Delta_{As} / t(95\%; one - side; g - 2)}{RSD_y} \right)^2},$$

2.3.2. Правильность

Правильность оценивают по двум критериям:

Критерий статистической незначимости. Систематическую составляющую неопределенности (δ) можно характеризовать отклонением среднего значения для степени извлечения (\bar{Z}) от 100%. Систематическая погрешность статистически неотличима от нуля, если отклонение \bar{Z} от 100% не превышает свой доверительный интервал:

$$\delta\% = \left| \bar{Z} - 100 \right| \leq \frac{\Delta_Z}{\sqrt{n}},$$

где Δ_Z — доверительный интервал, рассчитанный как указано в п. 2.3.3.

Критерий практической незначимости. Если приведенное выше соотношение не выполняется, используют критерий незначимости этой систематической погрешности по сравнению с максимально допустимой неопределенностью анализа:

$$\delta\% = \left| \bar{Z} - 100 \right| \leq 0.32 \cdot \Delta_{As}.$$

2.3.3. Прецизионность

Односторонний доверительный интервал Δ_Z не должен превышать максимально допустимую неопределенность результатов анализа (Δ_{As}):

$$\Delta_Z = S_Z(\%) \cdot t(95\%, n - 1) \leq \Delta_{As},$$

$$S_Z(\%) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{i=9} (Z_i - \bar{Z})^2}{n - 1}},$$

где S_Z — относительное стандартное отклонение, выраженное в процентах, рассчитанное для отношений «найдено : введено» для всех растворов;

t — односторонний коэффициент Стьюдента для вероятности 95% и числа степеней свободы $n - 1$.

2.4. Пример проведения эксперимента и расчета критериев

2.4.1. Линейность, правильность и прецизионность

Изучение сходимости и правильности рекомендуется проводить не менее чем из 9 определений, причем изучаемые концентрации должны охватывать диапазон методики. Поскольку изучение сходимости и правильности оценивается по отношению «найдено : введено» (в процентах) и проводится из данных, полученных при изучении линейности, наиболее оптимальной является схема, когда анализируют 9 модельных растворов, концентрации которых равномерно распределены в изучаемом диапазоне методики (плюс раствор сравнения, концентрация которого близка к номинальной).

Ниже даны результаты расчета критических значений для параметров линейности, прецизионности и правильности для следующих испытаний (табл. 5):

- **Количественное определение** (субстанции и готовые лекарственные препараты), в зависимости от допусков содержания. Диапазон методики 80–120%, изучаемые кон-

центрации 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, 105%, 110%, 115% и 120% (шаг 5%).

• **Однородность содержания для дозированных лекарственных форм.** Диапазон методики 70–130%, изучаемые концентрации 70%, 77.5%, 85%, 92.5%, 100%, 107.5% 115%, 122.5% и 130% (шаг 7.5%).

• **Растворение для твердых дозированных лекарственных форм.** Диапазон методики дан для нормирования степени высвобождения не менее 75% и не более 115%, и соответственно, составляет 55–135%. Изучаемые концентрации 55%, 65%, 75%, 85%, 95%, 105%, 115%, 125% и 135% (шаг 10%).

Таблица 5

Испытание	Диапазон D, шаг, RSD _y , %	B, %	max Δ _{Ab} , %	max δ, %	max S ₀ , %	min r	max a, %
Субстанции							
КО*	D = 80–120, шаг = 5 RSD _y = 13.69	1.0	1.0	0.32	0.53	0.99926	1.6
		1.5	1.5	0.48	0.79	0.99833	2.4
		2.0	2.0	0.64	1.06	0.99702	3.2
		2.5	2.5	0.80	1.32	0.99535	4.0
		3.0	3.0	0.96	1.58	0.99329	4.8
Готовые лекарственные препараты							
КО*	D = 80–120, шаг = 5 RSD _y = 13.69	5	1.60	0.51	0.84	0.99810	2.6
		7.5	2.4	0.77	1.27	0.99571	3.8
		10	3.2	1.02	1.69	0.99236	5.1
		15	4.8	1.54	2.5	0.98273	7.7
		20	6.4	2.1	3.4	0.96909	10.2
ОС**	D = 70–130, шаг = 7.5 RSD _y = 20.54	–	3.0	0.96	1.58	0.99710	3.1
Р***	D = 55–135, шаг = 10 RSD _y = 27.39	–	3.0	0.96	1.58	0.99839	2.1
Примечание: *КО — испытание «Количественное определение»; **ОС — испытание «Однородность содержания для дозированных лекарственных форм»; ***Р — испытание «Растворение для твердых дозированных лекарственных форм».							

2.4.2. Предел обнаружения (ПО) и предел количественного определения (ПКО)

ПО и ПКО могут быть рассчитаны из стандартного отклонения свободного члена линейной зависимости s_a и ее угла наклона b :

$$ПО = 3.3 \cdot s_a / b \approx 3.3 \cdot s_a$$

учитывая близость в нормализованных координатах величины b к единице.

В случае предельных тестов ПО должен быть незначим по сравнению с предельным нормируемым значением содержания примеси ImL . Для количественных испытаний незначимым по сравнению с ImL должен быть ПКО.

Предельные тесты: $ПО(\%) \leq 32\%$.

Количественные испытания: $ПКО(\%) \leq 32\%$.

В этом случае величины ПО и ПКО значимо не влияют на принятие решений о качестве.

Приложение 1 РАСЧЕТ НЕОПРЕДЕЛЕННОСТИ ФУНКЦИИ НЕСКОЛЬКИХ СЛУЧАЙНЫХ ПЕРЕМЕННЫХ [9]

Введение

Расчеты доверительных интервалов результатов методик анализа с использованием стандартного отклонения аналитического сигнала применимы лишь в том случае, если измеряемая величина (концентрация, содержание и т. д.) является функцией только одной случайной переменной. Такая ситуация обычно возникает при использовании прямых методов анализа (титрование, определение сульфатной золы, тяжелых металлов и т. д.). Однако большинство методик количественного определения в фармакопейном анализе являются косвенными, т. е. используются стандартные образцы. Следовательно, измеряемая величина является функцией как минимум, двух случайных переменных — аналитических сигналов (оптическая плотность, высота или площадь пика и т. д.) испытуемого и стандартного образцов. Кроме того, нередко возникает проблема прогнозирования неопределенности аналитической методики, состоящей из нескольких стадий (взвешивание, разбавление, конечная аналитическая операция), каждая из которых является по отношению к другой случайной величиной.

Таким образом, возникает общая проблема оценки неопределенности косвенно измеряемой величины, зависящей от нескольких измеряемых величин, в частности, как рассчитывать неопределенность всей аналитической методики, если известны неопределенности отдельных ее составляющих (стадий).

Если измеряемая на опыте величина y является функцией n независимых случайных величин x_i , т. е.

$$y = f(x_1, x_2, \dots, x_n), \quad (1.1)$$

и число степеней свободы величин x_i одинаковы или достаточно велики (>30 , чтобы можно было применять статистику Гаусса, а не Стьюдента), то дисперсия величины y связана с дисперсиями величин x_i соотношением (правило распространения неопределенностей):

$$s_y^2 = \sum_{i=1}^n \left(\frac{\partial f}{\partial x_i} \right)^2 \cdot s_{xi}^2. \quad (1.2)$$

Однако на практике степени свободы величин x_i обычно невелики и не равны друг другу. Кроме того, обычно интерес представляют не сами дисперсии (стандартные отклонения), а доверительные интервалы, рассчитать которые, используя уравнение (1.2), при небольших и неодинаковых степенях свободы невозможно. Поэтому для расчета неопределенности величины y (Δ_y) предложены различные подходы, среди которых можно выделить два основных: линейная модель и подход Уэлча — Сатертуэйта (Welch-Satterthwaite).

1. Линейная модель

Если случайные переменные x_i статистически независимы, то доверительный интервал функции Δ_y связан с доверительными интервалами переменных Δx_i соотношением (доверительные интервалы берутся для одной и той же вероятности):

$$\Delta_y^2 = \sum_{i=1}^n \left(\frac{\partial f}{\partial x_i} \right)^2 \cdot \Delta_{xi}^2. \quad (1.3)$$

Данное соотношение является обобщением соотношения (1.2).

В фармакопейном анализе измеряемая величина y представляет собой обычно произведение или частное случай-

ных и постоянных величин (масс навесок, разбавлений, оптических плотностей или площадей пиков и т. д.), т. е. (K — некая константа):

$$y = \frac{K \cdot x_1 \cdot x_2 \cdot \dots \cdot x_m}{x_{m+1} \cdot x_{m+2} \cdot \dots \cdot x_n} \quad (1.4)$$

В этом случае соотношение (1.2) принимает вид:

$$\Delta_{y,r}^2 = \sum_{i=1}^n \Delta_{xi,r}^2, \quad (1.5)$$

где использованы относительные доверительные интервалы.

Соотношение (1.4) применимо при любых (разных) степенях свободы (в том числе и бесконечных) для величин x_i . Его преимуществом является простота и наглядность. Использование абсолютных доверительных интервалов приводит к гораздо более громоздким выражениям, поэтому рекомендуется использовать относительные величины.

При проведении фармакопейного анализа в суммарной неопределенности ($\Delta_{As,r}$) анализа обычно всегда можно выделить такие типы неопределенностей: неопределенность пробоподготовки ($\Delta_{SP,r}$), неопределенность конечной аналитической операции ($\Delta_{FAO,r}$) и неопределенность аттестации стандартного образца ($\Delta_{RS,r}$). Величина $\Delta_{RS,r}$ обычно столь мала, что ею можно пренебречь. Учитывая это, а также то, что анализ проводится и для испытуемого раствора (индекс «*smr*»), и для раствора сравнения (индекс «*sti*»), выражение (1.5) можно представить в виде:

$$\Delta_{As,r} = \sqrt{[(\Delta_{sp,r}^{smr})^2 + (\Delta_{sp,r}^{sti})^2] + [(\Delta_{FAO,r}^{smr})^2 + (\Delta_{FAO,r}^{sti})^2]}. \quad (1.6)$$

При этом каждое из слагаемых рассчитывается из входящих в него компонентов по формуле (1.5).

Если число степеней свободы величин x_i одинаково или достаточно велики (>30), выражение (1.5) дает:

$$s_{y,r}^2 = \sum_{i=1}^n s_{xi,r}^2 \quad (1.7)$$

Это же соотношение получается при тех же условиях и из выражения (1.2).

2. Подход Уэлча — Сатертуэйта

В этом подходе дисперсию величины y (s_y^2) рассчитывают по соотношению (1.2), не обращая внимания на различие в степенях свободы (v_i) величин x_i . Для полученной дисперсии s_y^2 рассчитывают некое «эффективное» число степеней свободы v_{eff} (которое обычно является дробным), на основе которого затем по таблицам для заданной вероятности находят интерполяцией коэффициент Стьюдента. На основе его далее рассчитывают обычным путем доверительный интервал величины y (Δy).

$$v_{eff} = \frac{s_y^4}{\sum_{i=1}^n \frac{\left(\frac{\partial f}{\partial x_i}\right)^4 \cdot s_{xi}^4}{v_i}} \quad (1.8)$$

В фармакопейном анализе для определяемой величины y обычно выполняется уравнение (1.4). В этом случае в подходе Уэлча — Сатертуэйта соотношение (1.2) переходит в выражение (1.7), и соотношение (1.8) принимает более простой вид:

$$v_{eff} = \frac{s_{y,r}^4}{\sum_{i=1}^n \frac{s_{xi,r}^4}{v_i}} \quad (1.9)$$

Здесь величина $s_{y,r}^4$ рассчитывается из соотношения (1.7).

Подход Уэлча — Сатертуэйта обычно дает более узкие доверительные интервалы, чем линейная модель. Однако он гораздо сложнее в применении и не позволяет выделить так просто неопределенности разных этапов (с последующими рекомендациями по их минимизации), как линейная модель в форме выражения (1.6).

При прогнозе неопределенности анализа используются генеральные величины (с бесконечным числом степеней свободы). В этом случае подход Уэлча — Сатертуэйта совпадает с линейной моделью.

3. Примеры расчетов неопределенности функции нескольких переменных

Пример 1. Расчет неопределенности ВЭЖХ-анализа готового лекарственного препарата

В таблетке со средней массой 0.50 г содержится 0.050 г вещества А. В процессе проведения количественного определения методом ВЭЖХ брали навеску $m = 0.5052$ г порошка растертых таблеток в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводили растворителем до метки. Параллельно готовили раствор сравнения: 0.0508 г стандартного образца в мерную колбу вместимостью 50 мл с доведением растворителем до метки. Попеременно хроматографировали испытуемый раствор и раствор сравнения, получая по 5 хроматограмм. Ниже представлены площади полученных пиков (табл. 1.1):

Таблица 1.1

	Площади пиков (S и Sst) для хроматограммы №				
	1	2	3	4	5
Испытуемый раствор	13957605	13806804	13924245	13715195	14059478
Раствор сравнения	14240777	14102192	14316388	14205217	14409585

Конечная аналитическая операция

Рассчитаем средние значения, содержание вещества А в одной таблетке и относительные стандартные отклонения площадей пиков для испытуемого раствора и раствора сравнения в конечной аналитической операции.

1. Средние значения площадей пиков:

Испытуемый раствор:

$$(13957605 + 13806804 + 13924245 + 13715195 + 14059478)/5 = 13892665.$$

Раствор сравнения:

$$(14240777 + 14102192 + 14316388 + 14205217 + 14409585)/5 = 14254832.$$

2. Содержание анализируемого вещества А, в граммах, в пересчете на среднюю массу таблетки:

$$X = \frac{S \cdot m \cdot 50 \cdot 0.5}{S^{st} \cdot m_{st} \cdot 50} = \frac{13892665 \cdot 0.0508 \cdot 50}{14254832 \cdot 0.5052 \cdot 50} \cdot 0.5 = 0.0490.$$

3. Относительные стандартные отклонения площадей пиков:

Испытуемый раствор:

$$RSD = \frac{100}{13846665} \cdot \sqrt{\frac{(13957605 - 13892665)^2 + (13806804 - 13892665)^2 + (13924245 - 13892665)^2 + (13715195 - 13892665)^2 + (14059478 - 13892665)^2}{4}} = 0.97\%.$$

Аналогично для раствора сравнения:

$$RSD^{st} = 0.81\%.$$

Суммарная неопределенность пробоподготовки $\Delta_{SP,r}$

В соответствии с требованиями настоящего руководства (раздел D) неопределенности не должны превышать:

- мерной колбы вместимостью 50 мл — не более 0.17%;
- неопределенность взвешивания на аналитических весах — не более 0.2 мг (0.0002 г), что составляет:

- $100 \cdot 0.0002/0.5052 = 0.04\%$ для испытуемого образца;
- $100 \cdot 0.0002/0.0508 = 0.39\%$ для стандартного образца.

Данные неопределенности можно считать доверительными интервалами для вероятности 95%.

Суммарную неопределенность пробоподготовки рассчитывают по формуле (1.5):

$$\Delta_{SP,r} = \sqrt{(0.04^2 + 0.39^2) + (0.17^2 + 0.17^2)} = 0.46\% .$$

Отметим, что такой расчет является корректным для обоих подходов — линейной модели и подхода Уэлча — Сатертуэйта; поскольку число степеней свободы для каждого члена здесь бесконечно, то используется статистика Гаусса.

Расчет суммарной неопределенности анализа $\Delta_{As,r}$

Данный расчет различается для линейной модели и подхода Уэлча — Сатертуэйта.

1. Линейная модель

Общий случай. Рассчитаем неопределенность конечной аналитической операции $\Delta_{FAO,r}$ для испытуемого раствора и раствора сравнения. При расчете доверительных интервалов используем односторонний коэффициент Стьюдента для вероятности 95% (= 90% для двустороннего распределения), который для числа степеней свободы ($5 - 1 = 4$) равен 2.13. Доверительные интервалы рассчитывают для среднего из 5 результатов, поэтому в знаменателе стоит $\sqrt{5}$:

$$\Delta_{FAO,r}^{smp} = \frac{1}{\sqrt{5}} \cdot t(90\%, 4) \cdot RSD = \frac{1}{\sqrt{5}} \cdot 2.13 \cdot 0.97 = 0.92\% .$$

$$\Delta_{FAO,r}^{st} = \frac{1}{\sqrt{5}} \cdot t(90\%, 4) \cdot RSD_{st} = \frac{1}{\sqrt{5}} \cdot 2.13 \cdot 0.81 = 0.77\% .$$

Суммарная неопределенность конечной аналитической операции:

$$\Delta_{FAO,r} = \sqrt{(\Delta_{FAO}^{smp})^2 + (\Delta_{FAO}^{st})^2} = \sqrt{(0.92)^2 + (0.77)^2} = 1.20\% .$$

Используя уравнение (1.6), рассчитаем суммарную неопределенность анализа $\Delta_{As,r}$:

$$\Delta_{As,r} = \sqrt{0.46^2 + 1.20^2} = 1.29\% .$$

Использование объединенного стандартного отклонения
Суммарную неопределенность анализа можно уменьшить за счет использования объединенного стандартного отклонения для конечной аналитической операции. Для этого надо учесть, что RSD и RSD_{st} являются выборочными величинами одной и той же генеральной совокупности.

Проверим вначале по Фишеру гипотезу о равенстве дисперсий:

$$\frac{RSD^2}{RSD_{st}^2} = \frac{0.97^2}{0.81^2} = 1.434 < 6.388 = F(P_1 = 95\%; 4; 4).$$

Как видно, расчетное значение отношения дисперсий гораздо ниже табличного значения F -критерия на 95% уровне значимости. Поэтому можно принять гипотезу о равенстве дисперсий и использовать формулы раздела В для объединения выборок.

Рассчитывают объединенное стандартное отклонение по уравнению:

$$RSD_{tot} = \sqrt{[(0.97)^2 + (0.81)^2] / 2} = 0.89\% .$$

RSD_{tot} имеет число степеней свободы $2 \times (5 - 1) = 8$. Коэффициент Стьюдента для данного числа степеней свободы и односторонней вероятности 0.95 равен 1.86.

Тогда доверительные интервалы результатов конечной аналитической операции для испытуемого и стандартного растворов будут равны:

$$\begin{aligned} \Delta_{FAO,r}^{smp} &= \Delta_{FAO,r}^{st} = \frac{1}{\sqrt{5}} \cdot t(90\%, 8) \cdot RSD = \\ &= \frac{1}{\sqrt{5}} \cdot 1.86 \cdot 0.89 = 0.74\% . \end{aligned}$$

Суммарная неопределенность конечной аналитической операции равна:

$$\Delta_{FAO,r} = \sqrt{(\Delta_{FAO}^{smp})^2 + (\Delta_{FAO}^{st})^2} = \\ = \sqrt{(0.74)^2 + (0.74)^2} = 1.05\% .$$

Используя уравнение (1.6), рассчитаем суммарную неопределенность анализа $\Delta_{As,r}$:

$$\Delta_{As,r} = \sqrt{0.46^2 + 1.05^2} = 1.15\% .$$

Как видно, данная величина меньше величины, полученной для обычного случая (1.29%).

2. Подход Уэлча — Сатертуэйта

Найдем стандартное отклонение пробоподготовки из доверительного интервала $\Delta_{Sp,r} = 0.83\%$, используя коэффициент Гаусса 1.65 для односторонней вероятности 0.95 (поскольку число степеней свободы бесконечно — как для генеральной совокупности):

$$S_{Sp,r} = 0.39/1.65 = 0.24\% .$$

Из соотношения (1.5) найденное стандартное отклонение всей аналитической методики (RSD^2 и $(RSD^{st})^2$) делят на 5, как для дисперсий среднего результата):

$$s_{As,r} = \sqrt{s_{Sp,r}^2 + \frac{1}{5}[RSD^2 + (RSD^{st})^2]} = \\ = \sqrt{0.24^2 + \frac{1}{5} \cdot (0.97^2 + 0.81^2)} = 0.61 .$$

Находят эффективное число степеней свободы ν_{eff} . При этом для RSD и RSD^{st} число степеней свободы равно $5 - 1 = 4$, а для $S_{Sp,r}$ — бесконечность.

$$\nu_{eff} = \frac{s_{As,r}^4}{\frac{s_{Sp,r}^4}{\infty} + \frac{RSD^4}{5^2 \cdot 4} + \frac{(RSD^{st})^4}{5^2 \cdot 4}} = \\ = \frac{0.61^4}{0 + \frac{1}{100} \cdot (0.97^4 + 0.81^4)} = 10.5 .$$

Находим коэффициент Стьюдента для числа степеней свободы 10.5 и односторонней вероятности 0.95. Это 1.81 (интерполяция). Тогда доверительный интервал всей аналитической методики будет:

$$\Delta_{As,r} = 1.81 \cdot 0.61 = 1.10\% .$$

Как видно, доверительный интервал получается меньше, чем для линейной модели (1.29% или 1.15%).

Пример 2. Прогноз неопределенности спектрофотометрического анализа готового лекарственного препарата

При таких прогнозах всегда используются генеральные величины, поэтому применяется статистика Гаусса. Обычно используется коэффициент Гаусса 1.65 для односторонней вероятности 0.95.

При проведении спектрофотометрического количественного определения готового лекарственного препарата берут номинальные навески около $m = 0.50$ г (ГЛП) и $m_{st} = 0.050$ г (стандартный образец). Используются одинаковые разбавления для испытуемого раствора и раствора сравнения: навеска → 50 мл (мерная колба); 1 мл (пипетка) полученного раствора → 100 мл (мерная колба). Спектрофотометрическая неопределенность оптической плотности (по паспорту прибора) $s_{A,r} = 0.2\%$, неопределенность кюветы (экспериментально найдена) $s_{cell,r} = 0.1\%$. Предполагается, что будет проводиться 3-кратное измерение оптической плотности испытуемого раствора и раствора сравнения с выниманием кюветы. Необходимо провести прогноз неопределенности анализа.

1. Вначале найдем неопределенность пробоподготовки. Неопределенности не должны превышать:

— неопределенность взвешивания на аналитических весах — не более 0.2 мг (0.0002 г), что составляет $100 \times 0.0002 / 0.5 = 0.04\%$ для испытуемого образца и $100 \times 0.0002 / 0.050 = 0.40\%$ для стандартного образца;

- мерные колбы вместимостью 50 мл — 0.17%;
- мерные колбы вместимостью 100 мл — 0.12%;
- пипетка вместимостью 1 мл — 0.6%.

Полная неопределенность пробоподготовки составляет (учитывая испытуемый раствор и раствор сравнения):

$$\Delta_{SP,r} = \sqrt{\begin{matrix} (0.04^2 + 0.04^2) + (0.40^2 + 0.40^2) + \\ + (0.17^2 + 0.17^2) + (0.12^2 + 0.12^2) + \\ + (0.6^2 + 0.6^2) \end{matrix}} = 1.06\% .$$

Отсюда, кстати, видно, что основной вклад в неопределенность пробоподготовки вносит пипетка малого объема (0.6%) и маленькая навеска 0.05 г (0.4%).

2. Найдем неопределенность конечной аналитической операции (спектрофотометрии). Коэффициент 2 учитывает наличие испытуемого раствора и раствора сравнения:

$$\begin{aligned} \Delta_{FAO,r} &= 1.65 \cdot \sqrt{\frac{2 \cdot (s_{A,r}^2 + s_{cell,r}^2)}{3}} = \\ &= 1.65 \cdot \sqrt{\frac{2 \cdot (0.2^2 + 0.1^2)}{3}} = 0.30\% . \end{aligned}$$

3. Найдем теперь по формуле (1.6) полную прогнозируемую неопределенность анализа:

$$\Delta_{As,r} = \sqrt{1.060^2 + 0.30^2} = 1.10\% .$$

Как видно, основной вклад в полную неопределенность анализа вносит пробоподготовка (1.06%).

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Административный регламент Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения и социального развития по исполнению государственной функции по государственной регистрации лекарственных средств. — Утвержден приказом Министерства здравоохранения и социального развития РФ от 30 октября 2006 г. № 736.
2. ГОСТ Р 52249-2004. Правила производства и контроля качества лекарственных средств.
3. The rules governing medicinal products in the European Union. — Volume 4. — Good manufacturing practice. — Medicinal products for human and veterinary use. — Guide to good manufacturing practice for medicinal products. (Правила, регулирующие лекарственные средства в Европейском Союзе. — Том 4. — Надлежащая производственная практика. — Лекарственные препараты для человека и применения в ветеринарии. — Руководство по надлежащей производственной практике для лекарственных препаратов).
4. The Common Technical Document for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use. — ICH Harmonised Tripartite Guideline. — Brussels, February 6–7, 2002. (Общий технический документ для регистрации лекарственных средств для человека. — Гармонизированное трехстороннее руководство ICH. — Брюссель, 6–7 февраля 2002).
5. Commission Directive 2003/63/EC of 25 June 2003 amending Directive 2001/83/EC of the European Parliament and of the Council on the Community code relating to medicinal products for human use. Annex I:

- Analytical, Pharmacotoxicological and Clinical Standards and Protocols in Respect of the Testing of Medicinal Products. — Official Journal of the European Union. — № L 159/49 of 27.6.2003.
(Директива Комиссии 2003/63/ЕС от 25 июня 2003, дополняющая Директиву 2001/83/ЕС Европейского Парламента и Совета в отношении правил сообщества по лекарственным средствам для человека. Приложение I: Аналитические, фармакотоксикологические и клинические стандарты и протоколы относительно испытаний лекарственных средств. — Official Journal of the European Union. — № L 159/49 of 27.6.2003).
6. CPMP/ICH/381/95. Note for guidance on validation of analytical procedures: text and methodology. — London, June 1995.
(CPMP/ICH/381/95. Руководящие указания по валидации аналитических методов: термины и методология. — Лондон, июнь 1995).
 7. Technical Guide for the Elaboration of Monographs. — 4rd Edition. — European Pharmacopoeia, European Directorate for the Quality of Medicines. — 2005. — 67 p.
(Техническое руководство по разработке монографий. — 4-е издание. — Европейская Фармакопея, Европейский директорат по качеству лекарственных средств. — 2005. — 67 с.).
 8. Державна Фармакопея України. — 1 видання. — Валідація аналітичних методик и випробувань. — Харків: Рірег, 2001. — С. 58–67. — Доповнення 1. — Харків: Рірег, 2004. — С. 2–4.
 9. Державна Фармакопея України. — 1 видання. — Доповнення 1. — Статистичний аналіз результатів хімічного експерименту. — Харків: Рірег, 2004. — С. 187–214.

10. Стандартизована процедура валідації методик кількісного аналізу лікарських засобів методом стандарту / О.І. Гризодуб, Д.А. Леонтьєв, Н.В. Денисенко, Ю.В. Підпружников // Фармаком. — 2004. — № 3. — С. 3–17.
11. Выполнение тестов «Однородность содержания» и «Растворение» при серийном контроле качества лекарственных средств. 1. Общая схема эксперимента / А.И. Гризодуб, Д.А. Леонтьев, М.Г. Левин, Н.Н. Асмолова, Е.В. Вырова // Журнал органічної та фармацевтичної хімії. — 2004. — Т. 2, № 1 (5). — С. 24–34.
12. Стандартизованная процедура валидации методик контроля содержания примесей в готовых лекарственных средствах методом жидкостной хроматографии / А.И. Гризодуб, Д.А. Леонтьев, Т.Н. Доценко, В.А. Загорий // Фармаком. — 2005. — № 2/3. — С. 78–94.
13. Стандартизованная процедура валидации методик контроля остаточных растворителей в лекарственных средствах методом газовой хроматографии / А.И. Гризодуб, И.Г. Губаревич, Т.А. Карпова, Л.Е. Никишина, Д.А. Леонтьев // Фармаком. — 2005. — № 4. — С. 5–21.
14. USP Pharmacopoeia 30. Official from May 1 2007 to July 31 2007. General Chapter <1010> Analytical Data — Interpretation and Treatment.
(Фармакопея США 30-е издание. Действует с 1 мая 2007 г. по 31 июля 2007 г. Общая статья <1010> Результаты анализа — интерпретация и обработка).
15. General Information Chapter <1226> «Verification of Compendial Procedures». — Pharm. Forum. — 31 (2), 555–558 (2005).

- (Общая статья <1226> «Верификация фармакопейных методик». — Pharm. Forum. — 31 (2), 555—558 (2005) (проект).
16. ГОСТ Р ИСО 5725-1-2002. Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 1. Основные положения и определения.
 17. РМГ 29-99. Метрология. Основные термины и определения. — Минск: Межгосударственный совет по стандартизации, метрологии и сертификации, 1999.

ПОЯСНИТЕЛЬНАЯ ЗАПИСКА к руководству по валидации методик анализа лекарственных средств

1. Заказчик разработки данного руководства

Данный проект Руководства разработан Ассоциацией российских фармацевтических производителей и согласован Федеральной службой по надзору в сфере здравоохранения и социального развития Министерства здравоохранения и социального развития РФ для использования юридическими лицами, которые подают заявление о государственной регистрации лекарственных препаратов, экспертами, разработчиками и производителями лекарственных средств.

2. Обоснование целесообразности разработки данного руководства

В соответствии с Федеральным законом РФ «О лекарственных средствах» (ст. 19 «Государственная регистрация лекарственных средств», п. 9) для государственной регистрации лекарственного средства юридическое лицо, подающее заявление о государственной регистрации, представляет определенные документы. Приказом Министерства здравоохранения и социального развития РФ от 30 октября 2006 г. № 736 принят Административный регламент Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения и социального развития по исполнению государственной функции по государственной регистрации лекарственных средств (далее Административный регламент), который предусматривает в структуре регистрационного досье данные о валидации аналитических методик [1].

В соответствии с Федеральным законом РФ «О лекарственных средствах» (ст. 13 «Производство лекарственных средств») производить лекарственные средства необходимо

по соответствующим правилам организации производства и контроля качества; при этом запрещается производство лекарственных средств, не прошедших государственной регистрации в РФ. В соответствии с ГОСТ Р 52249-2004 «Правила производства и контроля качества лекарственных средств» [2] (раздел 6) отдел контроля качества должен обеспечить валидацию методик контроля качества. Однако ГОСТ Р 52249-2004 не регламентирует требований к проведению валидации аналитических методик и испытаний [2].

С учетом вышеизложенного актуальной проблемой является введение в РФ руководства, содержащего методические рекомендации относительно терминологии валидации, методологии проведения валидации и критериев приемлемости валидации аналитических методик. Рационально, чтобы эти методические рекомендации были гармонизированы с положениями соответствующего руководства ICH (International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use — Международная конференция по гармонизации технических требований к регистрации лекарственных средств для применения у человека) и Европейского Союза (ЕС), поскольку ГОСТ Р 52249-2004 гармонизирован с руководством по GMP (Good Manufacturing Practice), принятым в Европейском Союзе (ЕС) [3], а содержание сведений о лекарственных средствах в регистрационных досье, установленных в приложении 3 к Административному регламенту [1], в целом соответствует структуре регистрационного досье в современном международном формате и формате ЕС [4, 5]. Такая гармонизация необходима также в связи с п. 1.5 Административного регламента, в котором установлено, что «при осуществлении государственной регистрации к российским и зарубежным лекарственным средствам предъявляются одинаковые требования» [1].

3. Краткая характеристика объекта стандартизации

Объект стандартизации представляет собой методические рекомендации относительно проведения валидации аналитических методик и испытаний для контроля качества лекарственных средств. Разделы А, В и С гармонизированы с соответствующими нормативными документами ЕС и ICH [6,7] (степень соответствия — модифицированный). Поскольку в документах ЕС и ICH отсутствуют критерии приемлемости и оценки результатов валидации, в данное руководство включены материалы Государственной Фармакопеи Украины, а также научные рекомендации по критериям проведения валидации для методик количественного анализа [10,11,12,13]. Кроме того, во введении к данному руководству были внесены положения Фармакопеи США относительно верификации фармакопейных методик и испытаний [14,15].

Данное руководство распространяется на все аналитические методики и испытания, проводимые с целью разработки и регистрации лекарственных средств, а также в процессе их производства и выпуска, и устанавливает рекомендации относительно:

- терминологии и методологии при проведении валидации аналитических методик;
- специфики проведения валидации для некоторых фармакопейных методов анализа;
- критериев приемлемости и оценок результатов валидации аналитических методик.

Данное руководство не распространяется на действующие вещества или другое исходное сырье, а также на лекарственные средства, которые производят биотехнологическими методами, и препараты биологического происхождения, включая препараты, экстрагируемые из тканей или жидкостей человека или животных. Подходы к проведению валидации методик анализа биологических и биотехнологических препаратов в некоторых слу-

чаях могут быть иными, чем указано в данном руководстве.

Данное руководство предназначено для юридических лиц, которые подают заявление о государственной регистрации лекарственного средства в РФ, экспертов, которые проводят экспертизу при осуществлении государственной регистрации, а также для разработчиков и производителей лекарственных средств. Данное руководство рекомендуется применять при планировании и проведении валидации аналитических методик, используемых для контроля качества действующих и вспомогательных веществ, промежуточных продуктов и готовых лекарственных препаратов, а также при планировании и проведении научных исследований по разработке лекарственных средств и составлению регистрационных досье.

4. Описание ожидаемой экономической, социальной и/или иной эффективности применения данного руководства

Принятие в РФ международных и европейских стандартов в сфере лекарственных средств, в частности данного руководства, преследует гуманные, экономические и политические цели и является необходимым условием:

- обеспечения качества лекарственных средств в интересах потребителей;
- создания технических барьеров, гарантирующих поступление на рынок РФ только качественных лекарственных средств;
- преодоления технических барьеров в сфере международной торговли лекарственными средствами; выход отечественных производителей на мировые фармацевтические рынки и увеличение экспортного потенциала;
- вступление РФ в ВТО.

Данное руководство также предоставляет юридическим лицам, подающим заявление о государственной ре-

гистрации, разработчикам и экспертам методические рекомендации относительно сведений о валидации аналитических методик и испытаний контроля качества лекарственных препаратов, включаемых в регистрационном досье, что должно способствовать упорядочиванию процесса составления и экспертизы регистрационных материалов. Кроме того, данное руководство предоставляет методические рекомендации относительно проведения валидации аналитических методик и испытаний разработчикам и производителям лекарственных средств. До настоящего времени такие методические рекомендации в РФ отсутствовали.

5. Сведения о соответствии проекта руководства федеральным законам, техническим регламентам и иным нормативно-правовым актам РФ

Проект руководства соответствует Административному регламенту Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения и социального развития по исполнению государственной функции по государственной регистрации лекарственных средств, принятому приказом Министерства здравоохранения и социального развития РФ от 30 октября 2006 г. № 736, и не противоречит Федеральному закону РФ «О лекарственных средствах».

6. Сведения о соответствии проекта руководства международному (региональному) стандарту и о форме применения данного стандарта как основы для разработки проекта данного руководства, а в случае отклонения от международного (регионального) стандарта — мотивированное обоснование этого решения

В общем техническом документе (Common Technical Document — CTD), принятом ИСН, и приложении 1 к Директиве 2003/63/ЕС установлена структура представления данных о валидационных исследованиях. Определенные

разделы регистрационного досье должны содержать информацию о валидации аналитических методик и испытаний, терминология и методология которой регламентируются соответствующими руководствами. В СТД приведены ссылки на эти руководства, которые составляют методологическую основу представления данных по валидации в регистрационном досье.

Данное руководство разработано на основании руководства CPMP/ICH/381/95 [6], а также Технического руководства Европейской Фармакопеи по разработке монографий [7]. Эти нормативные документы регламентируют терминологию и методологию проведения валидации аналитических методик [6], а также специфику проведения валидации для некоторых фармакопейных методов анализа [7], однако в них отсутствуют критерии приемлемости. В связи с этим в раздел D настоящего руководства включены материалы Государственной Фармакопеи Украины («Валидация аналитических методик и испытаний») [8], «Статистический анализ результатов химического эксперимента» [9], а также научные рекомендации по критериям проведения валидации для методик количественного анализа [10,11,12,13]. Кроме того, во введении к данному руководству были внесены положения Фармакопеи США (30-е издание) относительно верификации фармакопейных методик и испытаний из общей статьи <1010> «Analytical Data — Interpretation and Treatment» («Результаты анализа — интерпретация и обработка») [14], а также из проекта общей статьи Фармакопеи США «Verification of Compendial Procedures» («Верификация фармакопейных методик») [15]. В настоящем руководстве введены метрологические термины «правильность» и «прецизионность», определения которых в целом соответствуют таковым в ГОСТ Р ИСО 5725-1-2002 [16]. В соответствии с РМГ 29—99 «Метрология. Основные термины и определения» [17] неопределенность результатов анализа характеризу-

вали доверительным интервалом (а не стандартным отклонением).

Настоящий проект руководства имеет следующую структуру:

- в разделе «Предисловие» дано обоснование необходимости разработки данного руководства и приведены соответствующие пояснения;
- в разделе «Введение» дана краткая характеристика объекта стандартизации, а также представлен идентичный перевод положений общей статьи <1010> «Analytical Data — Interpretation and Treatment. Method Validation» («Результаты анализа — интерпретация и обработка. Валидация методик») Фармакопеи США (30-е издание) [15] и проекта общей статьи Фармакопеи США «Verification of Compendial Procedures» («Верификация фармакопейных методик») относительно верификации фармакопейных методик и испытаний;
- в разделах А и В настоящего руководства представлен идентичный перевод, соответственно, части I и части II руководства CPMP/ICH/381/95 «Note for Guidance on Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology» [6] без изменения их объема и содержания с сохранением нумерации пунктов;
- в части С изложен идентичный перевод текста руководства Европейской Фармакопеи «Technical Guide for the Elaboration of Monographs» («Техническое руководство по разработке монографий») [7], относящегося к специфике валидации некоторых фармакопейных методов анализа;
- в раздел D «Рекомендации относительно критериев при проведении валидации для методик количественного анализа» включены идентичные переводы из статей Государственной Фармакопеи Украины «Валідація аналітичних методик і випробувань» («Валидация

аналитических методик и испытаний») [8] и научные рекомендации по критериям приемлемости результатов валидации [10, 11, 12, 13];

- в приложении 1 «Расчет неопределенности функции нескольких случайных переменных» приведены рекомендации относительно расчета неопределенности для методик количественного анализа на основании идентичного перевода раздела 10 общей статьи Государственной Фармакопеи Украины «Статистичний аналіз результатів хімічного експерименту» («Статистический анализ результатов химического эксперимента») [9];
- в разделе «Библиография» представлено библиографическое описание нормативных документов и научных статей, ссылки на которые приведены в тексте данного руководства.

В руководство внесены такие редакционные изменения:

- в разделе А данного руководства вместо упоминания заявок на регистрацию, подаваемых в ЕС, Японии и США, дана ссылка на положения Административного регламента [1];
- в разделе А дано примечание относительно разделов регистрационного досье в форматах STD и приложения 1 к Директиве 2003/63/ЕС (с библиографическими ссылками на эти документы), в которых приводят данные о валидации аналитических методик; это сделано в интересах юридических лиц, подающих заявление о регистрации зарубежных лекарственных препаратов в РФ и препаратов отечественного производства за рубежом;
- в разделе С приведены номера статей Европейской Фармакопеи, в которых описаны методы анализа; рядом с первым приведенным номером дана сноска и в конце страницы указано: «Здесь и далее по тексту циф-

ры в скобках обозначают номер статьи Европейской Фармакопеи, в которой описан данный метод анализа: European Pharmacopoeia. — 2.2.7. Optical Rotation. Рекомендуется пользоваться соответствующими статьями Европейской Фармакопеи до введения аналогичных гармонизированных статей в Государственную Фармакопею РФ». Далее в сносках указывали только номер и название статьи Европейской Фармакопеи.

7. Сведения о взаимосвязи проекта руководства со стандартами, утвержденными (принятыми) ранее и действующими в Российской Федерации в качестве национальных стандартов, а при необходимости также предложения по их пересмотру, изменению или отмене

Данный проект руководства не противоречит ГОСТ Р 52249-2004 «Правила производства и контроля качества лекарственных средств» в части раздела 6. В то же время рекомендуется внести изменения в ГОСТ Р 52249-2004 для гармонизации с Руководством по GMP ЕС, поскольку в ГОСТ Р 52249-2004 термин «валидация» относительно аналитических методик дается в качестве эквивалента термина «аттестация», который не используется в мире относительно понятия «валидация аналитических методик».

8. Сведения о публикации и размещении в информационной сети общего пользования

После утверждения и согласования данное руководство будет официально опубликовано и размещено на сайте Ассоциации российских фармацевтических производителей.

9. Перечень исходных документов и другие источники информации, использованные при разработке проекта руководства

1. Административный регламент Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения и социального

развития по исполнению государственной функции по государственной регистрации лекарственных средств. — Утвержден приказом Министерства здравоохранения и социального развития РФ от 30 октября 2006 г. № 736.

2. ГОСТ Р 52249-2004. Правила производства и контроля качества лекарственных средств.

3. The rules governing medicinal products in the European Union. — Volume 4. — Good manufacturing practice. — Medicinal products for human and veterinary use. — Guide to good manufacturing practice for medicinal products.

(Правила, регулирующие лекарственные средства в Европейском Союзе. — Том 4. — Надлежащая производственная практика. — Лекарственные препараты для человека и применения в ветеринарии. — Руководство по надлежащей производственной практике для лекарственных препаратов.)

4. The Common Technical Document for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use. — ICH Harmonised Tripartite Guideline. — Brussels, February 6–7, 2002.

(Общий технический документ для регистрации лекарственных средств для человека. — Гармонизированное трехстороннее руководство ICH. — Брюссель, 6–7 февраля 2002.)

5. Commission Directive 2003/63/EC of 25 June 2003 amending Directive 2001/83/EC of the European Parliament and of the Council on the Community code relating to medicinal products for human use. Annex I: Analytical, Pharmacotoxicological and Clinical Standards and Protocols in Respect of the Testing of Medicinal Products. — Official Journal of the European Union. — № L 159/49 of 27.6.2003.

(Директива Комиссии 2003/63/ЕС от 25 июня 2003, дополняющая Директиву 2001/83/ЕС Европейского Парламента и Совета в отношении правил сообщества по лекарственным средствам для человека. Приложение I: Анали-

тические, фармакотоксикологические и клинические стандарты и протоколы относительно испытаний лекарственных средств. — Official Journal of the European Union. — № L 159/49 of 27.6.2003.)

6. CPMP/ICH/381/95. Note for guidance on validation of analytical procedures: text and methodology. — London, June 1995.

(CPMP/ICH/381/95. Руководящие указания по валидации аналитических методов: термины и методология. — Лондон, июнь 1995.)

7. Technical Guide for the Elaboration of Monographs. — 4rd Edition. — European Pharmacopoeia, European Directorate for the Quality of Medicines. — 2005. — 67 p.

(Техническое руководство по разработке монографий. — 4-е издание. — Европейская Фармакопея, Европейский директорат по качеству лекарственных средств. — 2005. — 67 с.)

8. Державна Фармакопея України. — 1 видання. — Валидація аналітичних методик и випробувань. — Харків: Рірег, 2001. — С. 58–67. — Доповнення 1. — Харків: Рірег, 2004. — С. 2–4.

9. Державна Фармакопея України. — 1 видання. — Доповнення 1. — Статистичний аналіз результатів хімічного експерименту. — Харків: Рірег, 2004. — С. 187–214.

10. Стандартизована процедура валидації методик кількісного аналізу лікарських засобів методом стандарту / О.І. Гризодуб, Д.А. Леонтьев, Н.В. Денисенко, Ю.В. Підпружников // Фармаком. — 2004. — № 3. — С. 3–17.

11. Выполнение тестов «Однородность содержания» и «Растворение» при серийном контроле качества лекарственных средств. 1. Общая схема эксперимента / А.И. Гризодуб, Д.А. Леонтьев, М.Г. Левин, Н.Н. Асмолова, Е.В. Вырова // Журнал органічної та фармацевтичної хімії. — 2004. — Т. 2, № 1(5). — С. 24–34.

12. Стандартизованная процедура валидации методик контроля содержания примесей в готовых лекарственных средствах методом жидкостной хроматографии / А.И. Гризодуб, Д.А. Леонтьев, Т.Н. Доценко, В.А. Загорий // Фармаком. — 2005. — № 2/3. — С. 78–94.

13. Стандартизованная процедура валидации методик контроля остаточных растворителей в лекарственных средствах методом газовой хроматографии / А.И. Гризодуб, И.Г. Губаревич, Т.А. Карпова, Л.Е. Никишина, Д.А. Леонтьев // Фармаком. — 2005. — № 4. — С. 5–21.

14. USP Pharmacopeia 30. Official from May 1 2007 to July 31 2007. General Chapter <1010> Analytical Data — Interpretation and Treatment.

(Фармакопея США 30-е издание. Действует с 1 мая 2007 г. по 31 июля 2007 г. Общая статья <1010> Результаты анализа — интерпретация и обработка).

15. General Information Chapter 1226 «Verification of Compendial Procedures». — Pharm. Forum. — 31 (2), 555–558 (2005).

(Общая статья 1226 «Верификация фармакопейных методик». — Pharm. Forum. — 31 (2), 555–558 (2005) (проект).

16. ГОСТ Р ИСО 5725-1-2002. Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 1. Основные положения и определения.

17. РМГ 29-99. Метрология. Основные термины и определения. — Минск: Межгосударственный совет по стандартизации, метрологии и сертификации, 1999.

10. Сведения о разработчиках стандарта с указанием адреса электронной почты

Багирова Валерия Леонидовна:
Доктор фармацевтических наук, профессор.

Директор Института стандартизации и контроля лекарственных средств ФГУ «НЦЭСМП» Росздравнадзора, заведующая кафедрой организации и экономики фармации Московской Медицинской академии им. И.М. Сеченова.

E-mail: isls@regmed.ru

Гризодуб Александр Иванович:

Доктор химических наук, профессор.

Директор ГП «Научно-экспертный фармакопейный центр», ведущий научный сотрудник ГП «ГНЦЛС».

E-mail: gryzodub@bars.net.ua

Чибиляев Тимур Хайдарович:

Кандидат фармацевтических наук.

Зам. генерального директора, директор по развитию ОАО «Верофарм».

E-mail: chibilyaev@veropharm.ru

Леонтьев Дмитрий Анатольевич:

Кандидат фармацевтических наук.

Зам. директора ГП «Научно-экспертный фармакопейный центр» по научной работе, руководитель группы валидации и стандартных образцов отдела Государственной фармакопеи Украины ГП «Научно-экспертный фармакопейный центр».

E-mail: Leontiev@phukr.kharkov.ua; leontievd@yahoo.com

Ляпунов Николай Александрович:

Доктор фармацевтических наук, профессор.

Главный научный сотрудник и заведующий лабораторией жидких и мягких лекарственных средств ГП «Государственный научный центр лекарственных средств» (ГП «ГНЦЛС»).

E-mail: mikel@vl/kharkov.ua