

**Стандартизованные процедуры
валидации методик контроля
качества лекарственных средств**

А.И. Гризодуб

ГП «Украинский научный фармакопейный центр
качества лекарственных средств»

директор

доктор химических наук, профессор

Тел.: (057)-719-93-75

gryzodub@phukr.kharkov.ua

Литература

- 1.Гризодуб А.И. Стандартизованные процедуры валидации методик контроля качества лекарственных средств // В кн.: «Аналитическое обеспечение создания, стандартизации и контроля качества лекарственных средств». – Харьков: изд. «НТМТ». - Т. 3. - 2011.– С. 934-1063.
- 2.Гризодуб А.И., Левашова О.Л., Борщевский Г.И. Стандартизованная процедура валидации методик атомно-абсорбционного количественного определения лекарственных средств в варианте калибровочного графика // Фармаком. – 2011. - № 4. – С. 5-26.
- 3.Борщевский Г.И., Гризодуб А.И., Шевина В.Л. Стандартизованная процедура валидации методик количественного определения суммарных препаратов в варианте калибровочного графика // Фармаком. – 2013. - № 3. – С.24-33.
- 4.Гризодуб А.И., Борщевская М.И., Коноваленко В.А., Ремез О.С., Борщевский Г.И. Стандартизованная процедура валидации методики количественного определения при исследовании биоэквивалентности *in vitro* // Фармаком. – 2013. - № 4. – С. 36-50.
- 5.Гризодуб А.И., Евтифеева О.А., Проскурина К.И., Безумова О.В. Стандартизованная процедура валидации спектрофотометрических методик количественного определения лекарственных средств в варианте метода показателя поглощения // Фармаком. – 2014. - № 1. – С. 29-39; - № 2. – С. 45-54.

Область применения

Стандартизованные процедуры валидации аналитических методик (**СПВ**) были развиты во время разработки Национальной системы стандартных образцов ЛС. Однако развитые при этом подходы имеют гораздо более широкое применение и являются теоретической базой для основных научных направлений Фармакопейного центра:

1. Валидация методик анализа ЛС.
2. Аттестация стандартных образцов.
3. Аттестация тестовых образцов и оценка результатов Программы профессионального тестирования лабораторий контроля качества ЛС (ППТ).
4. Метрологическое обеспечение качества результатов анализа ЛС.

Основные идеи, развитые при разработке СПВ

1. Нормализованные координаты
2. Различие между количественным определением и контролем качества
3. Понятия Подтверждающего и Доказывающего подходов
4. Принцип незначимости
5. Понятие статистической и практической незначимости систематической погрешности
6. Прогноз полной неопределенности методики анализа

Необходимость в стандартизации подходов к валидации методик контроля качества лекарственных средств (ЛС)

В соответствии с требованиями Европейской Фармакопеи (ЕФ), гармонизованными с требованиями ИСН (Международной конференции по гармонизации), все методики контроля качества ЛС должны быть валидированы. Однако в данных документах излагаются лишь общие принципы валидации методик. Необходимые критерии приемлемости и процедура проведения валидации должны разрабатываться для конкретных методик с учетом их специфики. **Поэтому могут быть предложены разные критерии и подходы, которые формально не противоречат требованиям ЕФ-ИСН, однако будут давать разные выводы по валидации.**

Необходимость в стандартизации подходов к валидации методик контроля качества лекарственных средств (ЛС) (продолжение)

Это означает, что в соответствии с одним подходом (который, например, исповедует *производитель*) методика считается *валидированной*, а в соответствии с другим (который, например, исповедует *контролер*) – *нет*. В связи с этим, очевидна необходимость в разработке стандартных процедур проведения валидации методик контроля качества ЛС и в формулировке принципов этой стандартности.

Излагаемые ниже подходы предназначены для методик количественного определения ЛС в варианте **метода стандарта**, но основные принципы являются достаточно общими для *контроля качества любой серийной продукции с регламентируемыми допусками*.

Что такое валидация аналитической методики

Валидация аналитической методики – это экспериментальное доказательство того, что данная методика пригодна для решения поставленной аналитической задачи.

Валидировать можно только конкретную методику. Так, нельзя, например, валидировать методику количественного определения (МКО) кислоты ацетилсалициловой (КАС) методом кислотно-основного титрования в любых таблетках. Можно валидировать МКО КАС в таблетках КАС 0.500 г производства фармацевтической фирмы «Здоровье» методом кислотно-основного титрования в воде 0.1 М водным раствором натрия гидроксида при использовании индикатора фенолфталеина.

Валидационные критерии зависят от типа поставленной аналитической задачи.

Основные типы аналитических задач в фармацевтическом анализе

1. Определение концентрации какого-то соединения в каком-то объекте (например, определение содержания КАС в таблетках). В этом случае нас интересует именно сама концентрация, которая должна быть определена в достаточно широких пределах с заданной правильностью и прецизионностью. Примеры: изучение стабильности и профилей растворения.

2. Контроль качества какого-то объекта (например, тех же таблеток по содержанию КАС, допуски 90-110%). В этом случае нас интересует, находится ли (с заданной надежностью) концентрация анализируемого соединения в пределах допусков (препарат качественный) или нет (брак). При этом само значение концентрации (91 или 109%) нас, вообще говоря, не интересует. Пример - рутинный контроль качества таблеток КАС 0.5 г на предприятии или на стадии госконтроля.

Контроль качества предполагает формулировку, **что такое хорошо и что такое плохо** (брак).

ОСНОВНЫЕ ЭТАПЫ СТАНДАРТИЗАЦИИ ПРОЦЕССА ВАЛИДАЦИИ АНАЛИТИЧЕСКИХ МЕТОДИК

Стандартизацию процесса валидации методик анализа ЛС можно условно разбить на 5 этапов:

1. Стандартизация **процедуры** проведения валидации.
2. Стандартизация используемых **координат**.
3. Формулировка и стандартизация **критериев** приемлемости.
4. Стандартизация **представления** результатов валидации
5. **Прогноз** **полной** **неопределенности** методики анализа.

1. Стандартизация процедуры проведения валидации

Исследования линейности являются основными при валидации методик количественного определения, поскольку из полученных данных можно рассчитать и другие метрологические характеристики. Критерии линейности определяются количеством точек прямой, их концентрациями, процедурой анализа и допусками содержания по спецификации. Для ЛС типичным является применение сравнительных методов в варианте метода стандарта (хроматография, спектрофотометрия). Стандартизация процедуры позволяет стандартизовать и требования к метрологическим характеристикам прямой.

Исследования линейности целесообразно совместить с исследованиями прецизионности и правильности, что позволяет существенно сократить объем эксперимента.

1. Стандартизация процедуры проведения валидации (продолжение)

Учитывая это, а также требования ЕФ-ICH, минимально достаточным является использование $g = 9$ точек (концентраций), распределенных с равномерным шагом внутри диапазона (D) применения методики, который различен для разных тестов. Кроме того, параллельно проводится измерение и для *раствора сравнения* с концентрацией, близкой к номинальной. Концентрация и аналитический сигнал раствора сравнения используются для перехода в нормализованные координаты в соответствии с соотношениями (1). Таким способом мы получаем 9 точек, каждая из которых – это анализ по спецификации в условиях методики, которая валидируется.

Пример для КО: $D = 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115$ и 120% от номинального содержания.

2. Стандартизация используемых координат

При проведении валидационных исследований независимой переменной (абсциссой X) выступает концентрация, а зависимой (ординатой Y) – аналитический сигнал (высота или площадь пика, оптическая плотность и т.д.). Концентрации и аналитические сигналы 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). В то же время, нас обычно интересуют концентрации и аналитические сигналы не в реальных величинах, а в **процентах к номинальному (или нормируемому) значению**, т.е. в так называемых **«нормализованных»** координатах.

2. Стандартизация используемых координат (продолжение)

С практической точки зрения, именно в нормализованных координатах целесообразно и представлять концентрации и аналитические сигналы. Это 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_{sti} – концентрация этого же вещества в растворе (или образце) сравнения (которая очень близка к номинальной концентрации). Аналогично: A_i – аналитический сигнал анализируемого вещества для i -ого анализируемого раствора, A_{sti} – аналитический сигнал этого же вещества для раствора сравнения. Введем нормализованные координаты X_i , Y_i и Z_i , определив их следующим образом:

Нормализованные координаты:

$$X_i = \frac{C_i}{C_i^{st}} \cdot 100\%,$$

$$Y_i = \frac{A_i}{A_i^{st}} \cdot 100\%, \quad (1)$$

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

Преимущества нормализованных координат по сравнению с исходными величинами C_i , C_{sti} , A_i , A_{sti} :

1. Величины X_i и Y_i , независимо от специфики анализируемого вещества, всегда находятся в пределах одного диапазона применения методики анализа - вблизи 100%. Величина Z_i представляет собой коэффициент извлечения («найдено» в % к «введенному»).

2. График линейной зависимости Y_i от X_i ($Y_i = b \cdot X_i + a$), независимо от специфики анализируемого вещества, всегда лежит в одном и том же диапазоне (см. п. 1). Угол наклона прямой (b) всегда близок к 1. Свободный член прямой (a) незначимо (статистически или практически – см. ниже) отличается от нуля (что неудивительно, поскольку предполагается применимость метода стандарта). Это стандартизует представление графика линейной зависимости и делает его наглядным.

Преимущества нормализованных координат...

(продолжение)

3. Прямая $Y_i = b \cdot X_i + a$ характеризуется остаточным стандартным отклонением $SD_{Y,res}$. Обратная линейная зависимость $X_i = (1/b) \cdot Y_i + (-a/b) = b' \cdot Y + a'$ характеризуется остаточным стандартным отклонением $SD_{X,res}$. Учитывая близость угла наклона прямой (b) к 1 и незначимость свободного члена (a), получим :

$$SD_{Y,res} \approx SD_{X,res} = RSD_o. \quad (2)$$

Величины $SD_{Y,res}$ и $SD_{X,res}$ являются *относительными* стандартными отклонениями – по отношению к номинальным (или нормируемым) значениям A_{st} и C_{st} , что подчеркнуто в выражении (2) обозначением RSD_o .

4. Облако точек $Y(X)$ в координатах $Y - X$ можно охарактеризовать стандартными отклонениями SD_Y или SD_X . Так как средние значения величин X_i и Y_i близки к 100%, то величины SD_Y и SD_X являются относительными (по отношению к номинальным или нормируемым значениям) стандартными отклонениями и, учитывая п. 2, близкими друг к другу, т.е. ($g = 9$ – количество точек прямой):

$$SD_Y \approx SD_X = RSD_{range} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^g (X_i - \bar{X})^2}{g - 1}} \quad (3)$$

Величины RSD_{range} для различных диапазонов применения приведены в Таблице 1.

5. Величины Z_i соотношения (1) для точек ($g = 9$) регрессионной прямой характеризуются средним значением \bar{Z} и стандартным отклонением SD_Z , которое, учитывая близость величины \bar{Z} к 100 %, фактически, является относительным стандартным отклонением. Поэтому неопределенность методики анализа во всем диапазоне концентраций характеризуется доверительным интервалом, равным доверительному интервалу единичного значения Z :

$$\Delta_{As} = t(95\%, g - 1) \cdot SD_Z = 1.860 \cdot SD_Z \leq \max \Delta_{As} \quad (4)$$

Здесь $\max \Delta_{As}$ - максимально допустимое значение неопределенности методики.

3. Формулировка и стандартизация критериев приемлемости

валидация методики включает 3 основных этапа:

1. Получение валидационных характеристик.
2. Сравнение полученных величин с критическими значениями (критерии приемлемости).
3. Выводы о корректности методики.

Как видно, валидация методики обязательно предполагает формулировку и обоснование критериев приемлемости (что такое «хорошо» и что такое «плохо»).

Без наличия обоснованных критериев приемлемости валидация в принципе невозможна.

3. Формулировка и стандартизация критериев приемлемости (продолжение)

Рассмотрим типичные примеры:

- 1) При валидации по описанной выше процедуре методики КО некой **субстанции** с допусками содержания по спецификации 98-102% в аналитическом диапазоне АД = 80-120% получен коэффициент корреляции линейной зависимости $R_c = 0.998$ и суммарная неопределенность $\Delta_{As} = 1.9\%$. Это хорошо или плохо?
- 2) Аналогично, для КО неких **таблеток** с допусками содержания по спецификации 95-105% в том же АД получены значения $R_c = 0.999$, $\Delta_{As} = 1.7\%$. Это хорошо или плохо?

При обосновании критериев приемлемости возможно применение различных подходов, которые могут приводить к разным выводам по валидации. Излагаемый ниже подход основан на использовании **Линейной статистической модели**, **Принципа незначимости** и понятий **Доказывающего и Подтверждающего подходов**.

Так, с точки зрения нашего подхода, методика КО субстанции **корректна**, а таблеток **нет** (см. Табл. 1), хотя формально метрология для таблеток лучше.

3.1. ЛИНЕЙНАЯ СТАТИСТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ

Доверительный интервал функции Δ_y связан с доверительными интервалами случайных независимых переменных Δ_{xi} соотношением:

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

В фармакопейном анализе y представляет собой обычно произведение или частное случайных и постоянных величин (масс навесок, разбавлений, оптических плотностей или площадей пиков и т.д.):

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

В этом случае получим:

$$\Delta_{y,r}^2 = \sum_{i=1}^n \Delta_{xi,r}^2 \quad (5)$$

3.1.1. Взаимосвязь с другими статистическими моделями

В ЕС и США для расчета неопределенности функции нескольких случайных переменных широко применяется статистическая модель **Уэлча-Сатуртуэйта**. Данный подход дает несколько более узкие доверительные интервалы, чем линейная модель. Однако использование сложных расчетов и формул не позволяет получить какие-либо критерии приемлемости валидационных характеристик.

В то же время, если методика валидирована с использованием линейной статистической модели, то она тем более будет соответствовать валидационным критериям (если они будут когда-нибудь получены) модели Уэлча-Сатуртуэйта, поскольку ее критерии будут более либеральны, чем полученные нами для линейной модели.

3.2. ПРИНЦИП НЕЗНАЧИМОСТИ (ПН)

Формулировка:

Неопределенность методики анализа (или ее составляющая) не должна значительно влиять на принятие решений о качестве лекарственного средства.

3.2.1. МАТЕМАТИЧЕСКОЕ ВЫРАЖЕНИЕ ПН

Доверительный интервал Δ_2 является значимым на уровне $p\%$ (незначимым на уровне $100-p\%$) по сравнению с доверительным интервалом Δ_1 , если объединенный доверительный интервал Δ_p превышает Δ_1 не более, чем на $p\%$, т.е.:

$$\Delta_p = \sqrt{\Delta_1^2 + \Delta_2^2} \leq \left(1 + \frac{p}{100}\right) \cdot \Delta_1.$$

В принципе, можно задаваться любым уровнем значимости p . В аналитической практике обычно принят уровень значимости $p = 5\%$ (т.е. уровень незначимости 95%). В этом случае решением этого соотношения будет неравенство :

$$\Delta_2 \leq 0.32 \cdot \Delta_1. \quad (6)$$

Это неравенство является основным выражением ПН при выработке валидационных критериев приемлемости.

3.2.2. Применяется ли выражение $\Delta_2 \leq 0.32 \cdot \Delta_1$ в других моделях?

Требование, что неопределенность методики анализа должна быть, как минимум, в 3 раза меньше полуширины допуска содержания по спецификации, широко применялось в советской метрологии (без обоснования).

Такое же требование и также без обоснования содержится в известном руководстве Eurachem: Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement, 1995, Laboratory of the Government Chemist, London, UK. ISBN 0-948926-08-2.

Как видно, выражение (6) не ново. Новизной является его научное обоснование и математический смысл, что позволяет использовать его в самых разных приложениях и на любом уровне незначимости. В частности, для уровней незначимости 90% и 99% коэффициенты будут не 0.32, а соответственно 0.46 и 0.14.

3.3. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА ЛС

При контроле качества ЛС применяют два подхода:

- *Подтверждающий подход* – для субстанций.
- *Доказывающий подход* – для ГОТОВЫХ лекарственных средств (ГЛС).

Валидационные критерии для них существенно различаются.

3.3.1. ПОДТВЕРЖДАЮЩИЙ ПОДХОД ДЛЯ СУБСТАНЦИЙ

В случае субстанций содержание основного вещества нам известно **до** проведения количественного определения (КО). Оно равно $[100\% - \text{содержание примесей}]$ (примеси определяются в других тестах). Для фармацевтических субстанций содержание примесей (кроме воды) обычно очень незначительно и незначимо по сравнению с допусками содержания по спецификации ($\pm B\%$). Таким образом, при КО субстанций мы лишь **подтверждаем**, что найденное содержание основного вещества статистически значимо не отличается от 100%. Поэтому допуски содержания для субстанций определяются только предельно допустимой неопределенностью самого КО ($\max \Delta_{As}\%$), т.е.:

$$\text{Субстанции:} \quad \max \Delta_{As} \% = B. \quad (7)$$

3.3.2. ДОКАЗЫВАЮЩИЙ ПОДХОД ДЛЯ ГЛС

При КО ГЛС важна **фактическая** концентрация анализируемого вещества (которая может колебаться в очень широких пределах за счет технологических факторов). Нам необходимо **доказать**, что найденная концентрация находится в пределах допусков содержания ($\pm B\%$).

В соответствии с принципом незначимости, предельная неопределенность методики КО ГЛС (**$max\Delta_{As}\%$**) должна быть незначима по сравнению с допусками содержания. В этом случае она значимо не влияет на принятие решений о качестве. Т.е.:

$$\text{ГЛС:} \quad \mathit{max} \Delta_{As} \% = 0.32 \cdot B. \quad (8)$$

3.4. Правильность. Статистическая и практическая незначимость систематической погрешности

Обычным требованием к систематической погрешности (δ) является ее статистически незначимое отличие от нуля – т.е. она не должна превосходить случайную составляющую неопределенности результата. Это означает, что она не должна превосходить доверительный интервал среднего значения \bar{Z} , т.е. должно выполняться неравенство ($g = 9$):

Статистическая незначимость:

$$\delta\% = |\bar{Z} - 100| \leq \Delta_{\bar{Z}} = \frac{\Delta_{As}}{\sqrt{g}} = \frac{\Delta_{As}}{3}. \quad (9)$$

3.4. ...Статистическая и практическая незначимость систематической погрешности (продолжение)

Из соотношения (9) видно, что критерий **статистической незначимости** систематической погрешности δ зависит от фактической неопределенности анализа ΔA_s , ужесточаясь с ее уменьшением (т.е. с повышением точности). Однако данное требование не является корректным, поскольку, чем выше точность анализа (например, за счет большого числа параллельных измерений), тем меньшие значения δ становятся статистически значимыми. Наоборот, загробляя результаты (например, уменьшая число параллельных измерений), можно даже большую величину δ сделать незначимо отличающейся от нуля.

Поэтому при проведении валидации более правильным является использование понятия **практической незначимости** систематической погрешности.

Практическая незначимость

Систематическая погрешность δ является **практически незначимой** для решения поставленной задачи контроля качества ЛС, если она является незначимой по сравнению с максимально допустимой неопределенностью анализа $\max \Delta_{As}$ из соотношений (7-8), т.е. :

$$\text{Субстанции: } \delta \leq \max \delta = 0.32 \cdot \max \Delta_{As} = 0.32 \cdot B. \quad (10)$$

$$\text{ГЛС: } \delta \leq \max \delta = 0.32 \cdot \max \Delta_{As} = 0.1 \cdot B. \quad (11)$$

Из соотношений (10-11) видно, что критерий **практической незначимости** зависит только от допусков содержания, но не зависит (в отличие от **статистической незначимости**) от фактической неопределенности анализа Δ_{As} . Величины $\max \delta$ приведены в Табл. 1.

3.4. Критерии приемлемости линейной зависимости

3.4.1. Остаточное стандартное отклонение RSD_o

Доверительный интервал разброса точек вокруг прямой $Y_i = b \cdot X_i + a$ равен $t(95\%, g-2) \cdot RSD_o$ и представляет собой (при использовании стандартизованной процедуры п. 1) доверительный интервал неопределенности методики анализа (Δ_{As}), который должен удовлетворять неравенствам (7-8). Учитывая это, получим требования к RSD_o для $g = 9$:

Субстанции:
$$RSD_o \leq B / t(95\%, g - 2) = 0.53 \cdot B. \quad (12)$$

ГЛС:
$$RSD_o \leq 0.32 \cdot B / t(95\%, g - 2) = 0.17 \cdot B. \quad (13)$$

Используя уравнения (12-13), предельные величины RSD_o можно табулировать для различных допусков содержания. Для тестов «Растворение» и «Однородность содержания» $\Delta_{As} = 3.0\%$.

3.4.2. Коэффициент корреляции

Принимая во внимание соотношения (2-3), коэффициент корреляции может быть вычислен из соотношения:

$$R_c = \sqrt{1 - \frac{RSD_0^2}{RSD_{range}^2}}. \quad (14)$$

Подставляя в уравнение (14) величины RSD_{range} и предельные значения RSD_0 из Таблицы 1, получим критические (минимальные) значения коэффициента корреляции R_c для различных испытаний, $g = 9$ точек и различных допусков содержания B (см. Таблицу 1).

3.4.2. Коэффициент корреляции (продолжение)

Иногда удобно проводить валидацию методики, которая была бы пригодна одновременно для проведения тестов «Количественное определение» (КО), «Однородности содержания» (ОС) и «Растворение» (Р). В этом случае в качестве допусков содержания (B) необходимо выбирать минимальные (из требований для тестов КО, ОС и Р) значения (обычно это требования для КО), соответствующие им значения остаточного стандартного отклонения RSD_o , критические значения свободного члена a для теста Р (как имеющего наименьший нижний предел диапазона), а критические значения коэффициента корреляции R_c рассчитывать из этих величин и реального максимально широкого диапазона (обычно это для ОР). Результаты таких расчетов также приведены в Таблице 1.

3.4.3. Свободный член. Статистическая и практическая незначимость

Отрезок, отсекаемый на оси ординат (свободный член прямой – a), характеризует систематическую погрешность при анализе методом стандарта. В соответствии с п.3.3, требования к нему могут быть двух типов:

1) **Статистическая незначимость**: величина a должна быть меньше доверительного интервала своей неопределенности, т.е. для $g = 9$:

$$a \leq t(95\%, g - 2) \cdot s_a = 1.89 \cdot s_a. \quad (15)$$

Здесь s_a – стандартное отклонение свободного члена прямой (a), найденное методом наименьших квадратов

2) Практическая незначимость

Величина a является практически незначимой для решения поставленной задачи, если вносимая ею систематическая погрешность не превышает максимальных значений (10-11). В нормализованных координатах критерий практической незначимости величины a для **метода стандарта** имеет вид :

$$a \leq \max a = \left| \frac{\max \delta}{1 - (X_{min} / 100)} \right| = \left| \frac{0.32 \cdot \Delta_{As}}{1 - (X_{min} / 100)} \right|. \quad (16)$$

Здесь X_{min} - минимальная граница диапазона применения методики (в нашем случае 80, 70 или 55%), а величина Δ_{As} должна удовлетворять соотношениям (7-8). **Выражение (16) практической незначимости применяют только в случае невыполнения критерия статистической незначимости (15).** Критические значения a приведены в Таблице 1.

Table 1. Примеры валидационных критериев для разных допусков содержания B и числа точек $g = 9$

$B\%$	$\max \Delta_{As}\%$	$\max \delta\%$	$RSD_o\%$	$\min R_c$	$\max a\%$
Субстанции: КО, Диапазон 80-120%, $RSD_{range} = 13.7\%$.					
1.0	1.0	0.32	0.53	0.9993	1.6
2.0	2.0	0.64	1.06	0.9970	3.2
ГЛС: КО + Р + ОС					
Диапазон 60-135%, $RSD_{range} = 25.7\%$.					
5	1.60	0.51	0.84	0.9995	2.4
7.3	2.34	0.75	1.23	0.9989	2.4
10	3.20	1.02	1.56	0.9981	2.4
ГЛС: КО, Диапазон 80-120%, $RSD_{range} = 13.7\%$.					
5	1.60	0.51	0.84	0.9981	2.6
10	3.20	1.02	1.69	0.9924	5.1

3.5. Предел обнаружения (*ПО*) и предел количественного определения (*ПКО*)

Данные величины не требуются при проведении валидации методик количественного определения, но они полезны как информация о том, насколько диапазон применения методики превосходит ее предельные возможности («запас прочности» методики). В случае контроля примесей нахождение величин *ПО* и *ПКО* является обязательным.

В соответствии с ГФУ, *ПО* и *ПКО* могут быть рассчитаны из стандартного отклонения свободного члена линейной зависимости s_a и ее угла наклона b (который близок к 1 в нормализованных координатах):

$$ПО = 3.3 \cdot s_a / b \approx 3.3 \cdot s_a \quad (17)$$

$$ПКО = 10 \cdot s_a / b \approx 10 \cdot s_a \quad (18)$$

3.5. *ПО* и *ПКО* (продолжение)

Использование для расчетов *ПО* и *ПКО* характеристик линейной зависимости гораздо надежнее и корректнее применения отношения сигнал/шум, поскольку учитывает не только шум, но и неопределенность пробоподготовки, которая, например, в случае парофазного анализа методом газовой хроматографии может быть определяющей.

Если линейная зависимость строилась в нормализованных координатах (т.е. $Y_i = b \cdot X_i + a$), то величины *ПО* и *ПКО* находятся в процентах к концентрации раствора сравнения, что позволяет легко оценить «запас прочности» методики.

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*. Переходя в нормализованные координаты (в процентах к *ImL*) и учитывая принцип незначимости (5-6), получим:

Предельные тесты $\hat{I}\hat{I} \leq \max \hat{I}\hat{I} = 32\%.$ (19)

Количественные тесты $\hat{I}\hat{E}\hat{I} \leq \max \hat{I}\hat{E}\hat{I} = 32\%.$ (20)

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

Из соотношений (19-20) следует важный вывод: при контроле качества ЛС (в том числе и при контроле примесей) сами величины *ПО* и *ПКО* **интереса не представляют**; важно, чтобы они не превышали критические значения (19-20). Это существенно облегчает нахождение этих величин.

Есть еще один важный аспект. Обычно мы не можем получить абсолютно чистое основное вещество и поэтому при контроле примесей приходится считаться с **неизбежным разложением** основного вещества при пробоподготовке, хранении растворов и хроматографировании, что приводит, соответственно, к увеличению (иногда в несколько раз по сравнению с исходным) содержания обнаруживаемых примесей. Это приводит к тому, что для **каждого образца существует некоторая предельная минимальная концентрация примесей**, ниже которой мы уже обнаруживаем не реальное содержание примесей в исходном испытуемом образце, а то, которое образовалось в процессе пробоподготовки, хранения и хроматографирования. Поэтому работа в области очень малых концентраций примесей чревата большими систематическими погрешностями. Этим недостатком лишен подход, основанный на соотношениях (19-20).

3.6. Внутрिलाбораторная точность

Целесообразно применение *Подтверждающего подхода* - доверительный интервал результатов (Z), полученных в разных условиях, не должен превышать максимально допустимой неопределенности методики анализа $\max \Delta_{As}$ уравнений (7-8) и Таб. 1. Для этого анализируют по методике спецификации $n = 5$ образцов (навесок) одной и той же серии исследуемого препарата в $m = 3$ разных дня. Исследования проводят разные аналитики, на разном оборудовании (спектрофотометры, хроматографические колонки и др.). Все полученные результаты (Z_i) должны принадлежать одной и той же генеральной совокупности. Поэтому для них рассчитывают объединенное среднее значение Z_{intra} , стандартное отклонение $SD_{Z-intra}$ % и относительный доверительный интервал Δ_{intra} %. Величина Δ_{intra} не должна превосходить $\max \Delta_{As}$ уравнений (7-8) и Таб. 1, т.е. :

$$\begin{aligned} \Delta_{intra} &= t[95\%, (n \cdot m - 1)] \cdot SD_{Z-intra} = \\ &= 1.76 \cdot SD_{Z-intra} \leq \max \Delta_{As}. \end{aligned} \quad (21)$$

3.7. Стабильность растворов

Изучение стабильности анализируемых растворов является одной из характеристик **робастности**. Обычно надо показать, что растворы являются стабильными не менее 1 часа. Это означает, что вносимая их нестабильностью систематическая погрешность δ не превосходит предельного значения ***max δ*** из Табл. 1.

Критерии стабильности различаются для спектрофотометрии и хроматографии.

В случае **спектрофотометрии методом стандарта** (испытуемый и стандартный растворы готовят одновременно) надо показать, что изменение отношения оптических плотностей испытуемого и стандартного растворов (в нормализованных координатах это изменение величины ***Y***) не превосходит в течение 1 часа величины ***max δ*** из Табл. 1. Для этого параллельно измеряют их оптические плотности через 0, 15, 30, 45 и 60 минут, определяют величины ***Y*** и рассчитывают доверительный интервал **ΔY %**. Он не должен превосходить ***max δ*** из Табл. 1.

3.7. Стабильность растворов (продолжение)

В случае хроматографического количественного определения методом стандарта такой подход принципиально невозможен из-за длительности хроматографирования (одна хроматограмма занимает обычно около 20 мин). Однако это имеет и свои преимущества для доказательства необходимой стабильности растворов. Действительно, если мы приготовили и провели хроматографирование 10 растворов для изучения линейности, то это время значительно превышает время анализа 1-3 образцов, которые обычно анализируют на практике. Поэтому положительные результаты точности и правильности, полученные при изучении линейности являются подтверждением необходимой стабильности растворов. Другим доказательством является практически незначимое различие ($\leq \sqrt{2 \cdot \max \Delta A_s}$) величин Z для первого и последнего хроматографируемого растворов.

4. Прогноз полной неопределенности методики количественного определения

Для подтверждения того, что методика будет воспроизводиться в другой лаборатории, **недостаточно результатов валидации в одной лаборатории**, поскольку уровень оборудования ее может быть гораздо выше достаточных по Фармакопее требований. **Необходим прогноз полной неопределенности методики** в соответствии с этими фармакопейными требованиями.

Прогнозируемая полная неопределенность результатов анализа Δ_{As} не должна превышать максимально допустимого значения $max\Delta_{As}$ (Табл. 1). Она рассчитывается по формуле:

$$\Delta_{As} = \sqrt{\Delta_{SP}^2 + \Delta_{FAO}^2} \quad (22)$$

Здесь: Δ_{SP} – неопределенность пробоподготовки (прогноз);
 Δ_{FAO} – неопределенность конечной аналитической операции (прогноз).

Неопределенность пробоподготовки Δ_{SP} может быть рассчитана по формуле линейной статистической модели:

$$\Delta_{SP} = \sqrt{\sum_i^n \Delta_{V,i}^2} \quad (23)$$

Здесь $\Delta_{V,i}$ – составляющая неопределенности, связанная с конкретной операцией пробоподготовки (взятие навески, аликвоты малого объема, доведение до объема в мерной колбе и др.), выраженная как односторонний относительный доверительный интервал для уровня надежности 95 %. При этом следует использовать предельную неопределенность мерной посуды, рекомендованную ГФУ.

Неопределенность конечной аналитической операции Δ_{FAO}

Хроматографические методики. Целесообразно исходить из предельного **RSD**, регламентированного в АНД разделом «Пригодность хроматографической системы».

В случае *спектрофотометрических методик* требования спецификаций спектрофотометров к повторным измерениям оптической плотности с выниманием кювет (**RSD_A**) отсутствуют, хотя имеются рекомендации ГФУ ($\leq 0.25\%$). Поэтому при прогнозе Δ_{FAO} следует использовать величину **RSD_A = 0.52%**, полученную при обширном межлабораторном эксперименте в рамках ППТ. Данная величина характеризует ту реальную точность, которая в настоящее время достижима в отечественных государственных лабораториях.

Неопределенность конечной аналитической операции Δ_{FAO} (продолжение)

Учитывая наличие 2 растворов - испытуемого и раствора сравнения, - а также рекомендации ГФУ о не менее 3 параллельных измерениях оптической плотности с выниманием кюветы для каждого раствора, получим для спектрофотометрического анализа :

$$\Delta_{FAO} = \sqrt{2} \cdot \frac{RSD_A \cdot 1.65}{\sqrt{3}} = 0.70\% \quad (24)$$

1.65 – коэффициент Гаусса для односторонней вероятности 95%.
Выражение (24) характеризует ту неопределенность конечной аналитической операции спектрофотометрического анализа, которая характерна в настоящее время для отечественной системы государственных лабораторий контроля качества ЛС .

Эксперимент

Объект: таблетки **Амброксола г/х (АГХ) 30 мг.**

Валидируемые процедуры: *СФ* *Количественное определение, Растворение* и *Однородность содержания.*

Допуски содержания: $B = \pm 7.3\%$, Диапазон: 60-135%.

Линейность ($Y_i = b \cdot X_i + a$).

Пара- метры	Результат	Требования Табл. 1	Выводы
b	0.9937	-	-
s_b	0.0087		
a	0.78	2.4	Соотв.
s_a	0.86		
RSD_o	0.58	1.23	Соотв.
R_c	0.9997	0.9989	Соотв.

Предел количественного определения (факультативно):

$ПКО = 8.6\% < 32\%$, **соответствует** требованиям (20).

Рис. 1. Линейная зависимость оптической плотности (Y) от концентрации АГХ (X) в нормализованных координатах

$$Y_i = 0.9937 \cdot X_i + 0.78$$

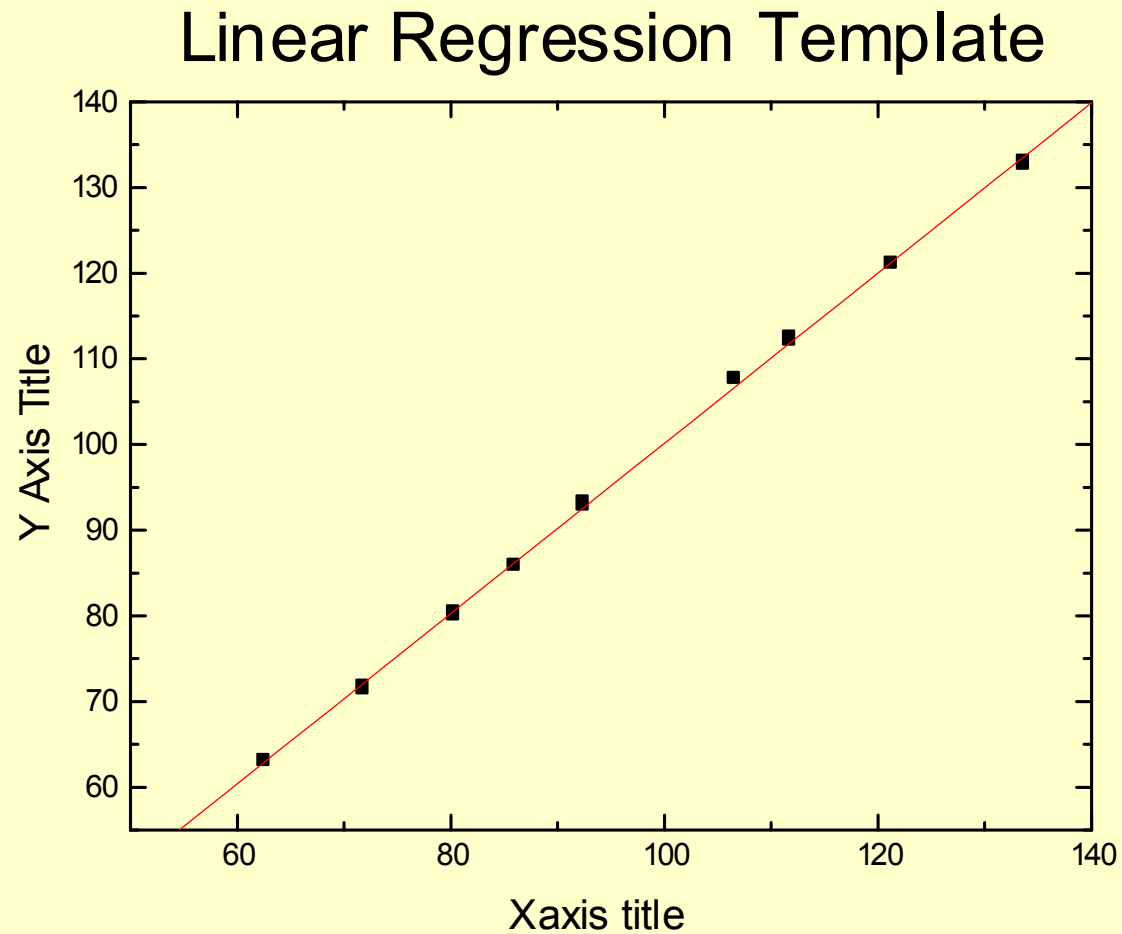


Табл. 2. Прецизионность и правильность
Результаты анализа искусственных смесей (ИС)

ИС	Масса АГХ, мг ($m_{st}=29.7$)	X_i %	A $A_{st} = 0.732$	Y_i %	Z_i %
1	18.6	62.51	0.462	63.1	100.9
....
9	39.8	133.7	0.973	132.8	99.4
Среднее =					100.3
$SD_Z =$					0.58
$\Delta_{As} \leq 2.34$					1.07 Соотв.
$\delta =$					0.30
<i>Незначимость систематической погрешности:</i>					
<u>Статистическая:</u> $\delta \leq 1.07/3 = 0.36$					Соотв.
<u>Практическая:</u> $\delta \leq 0.73$					Соотв.
Общее заключение:					Соотв. ⁵¹

Табл. 3. Внутрिलाбораторная точность

№ искусственной смеси	$Z_i, \%$		
	1 день	2 день	3 день
1	99.42	99.66	99.96
2	99.57	99.76	98.87
3	97.23	96.99	99.09
4	97.53	97.63	98.61
5	99.53	99.12	98.53
Среднее	98.65	98.63	99.01
Объединенное среднее	98.77		
SD_Z	0.98		
$\Delta_{inter} \leq 2.34$	1.76·0.98 = 1.72		

Вывод: Внутрिलाбораторная точность **соответствует** требованиям

Табл. 4. Стабильность растворов

Время, МИН	Оптическая плотность		Y, %
	Испытуемый раствор	Раствор сравнения	
0	0.7522	0.7560	99.50
15	0.7527	0.7567	99.46
30	0.7539	0.7595	99.26
45	0.7549	0.7592	99.44
60	0.7567	0.7618	99.33
Среднее	0.7541	0.7586	99.40
RSD%	0.24	0.31	0.10
$\Delta Y \% \leq 0.73$			0.22

Вывод: Стабильность р-ров **соответствует** требованиям.

Прогноз полной неопределенности анализа Δ_{As} .

Массы: АГХ RS – 30 мг, порошок таблеток – 100 мг.

Разбавления - одинаковы для испытуемого и раствора сравнения: 100 мл мерные колбы, 2 раза; 10 мл пипетка.

Используя уравнение (23) и требования ГФУ к точности взвешивания и мерной посуды, получим неопределенность пробоподготовки $\Delta_{SP} = 1.02\%$.

Из уравнения (24) получим неопределенность конечной аналитической операции (спектрофотометрии) $\Delta_{FAO} = 0.70\%$.

Из уравнения (22) получим полную прогнозируемую неопределенность анализа $\Delta_{As} = 1.24\% < \max \Delta_{As} = 2.34\%$.

Как видно, прогнозируемая неопределенность анализа соответствует требованиям Табл. 1, т.е. методика будет воспроизводиться в других контрольных лабораториях.

**Рис. 2. Диаграмма распределения неопределенности
пробоподготовки по операциям**



Как видно, наибольший вклад вносят взятие навески стандарта АГХ (операция 1) и взятие аликвот по 10 мл (операции 3, 7). Такое распределение неопределенностей пробоподготовки является достаточно характерным.

СПВ уже разработаны для:

1. Количественное определение (КО) СФ, ГХ и ВЭЖХ методом стандарта (МС).
2. Методики КО для тестов «Растворение» и «Однородность содержания»
3. Методики КО для изучения профилей растворения при изучении биоэквивалентности “in vitro”.
4. КО методом титриметрии.
5. КО ААС методом стандарта и калибровочного графика.
6. КО суммарных биопрепаратов методом калибр. графика.
7. КО СФ методом показателя поглощения.
8. Контроль сопутствующих примесей ГХ и ВЭЖХ методом стандарта.
9. Контроль остаточных количеств летучих органических растворителей ГХ методом добавок.

СПВ введена в ГФУ, является общепринятой в Украине и ⁵⁶ рекомендована в Российской Федерации.



Дякую за увагу!