

2. МЕТОДОЛОГІЯ¹

2.1. Вступ

Цей розділ є додатковим щодо основного тексту і представляє обговорення валідаційних характеристик, які необхідно розглядати під час валідації аналітичних процедур. Мета — надати деякі вказівки і рекомендації щодо того, як слід розглядати різні валідаційні характеристики для конкретної методики. У деяких випадках (наприклад, для демонстрації специфічності) необхідно визначати придатність сукупності методик гарантувати якість субстанції або готового лікарського засобу. Крім того, у цьому розділі наведена інформація про дані, які необхідно подавати в реєстраційних документах.

У звіт із валідації мають бути включені всі дані, отримані в процесі валідації, і формули, використані для розрахунків, з відповідним їх обговоренням.

Інші підходи, ніж наведені в цьому розділі, можуть бути коректними та прийнятними. Вибір процедури для валідації і протоколу, які найкраще підходять для цього лікарського засобу, є відповідальністю заявника. Однак необхідно пам'ятати, що головною метою валідації є доказ того, що методика є підходящою для свого призначення.

Через складну природу лікарського засобу, для валідації методик контролю якості біологічних та біотехнологічних препаратів можуть використовуватися інші підходи.

Під час проведення валідації необхідно використовувати лише стандартні зразки з відомими характеристиками, підтвердженими документально. Необхідний ступінь їх чистоти залежить від завдань, які розв'язуються під час їх використання.

Різні валідаційні характеристики розглядаються далі в окремих розділах.

Послідовність розгляду валідаційних характеристик відбиває процес, за яким може розроблятися і валідуватися аналітична методика.

Однак доцільно планувати експеримент так, щоб відповідні валідаційні характеристики вивчалися одночасно, наприклад: специфічність, лінійність,

¹ Текст ICH (International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use), прийнятий і затверджений у 1996 р. Узятий із «Технічного керівництва з розробки монографій» Європейської Фармакопеї (Technical Guide for the Elaboration of monographs. 7th Edition. — European Pharmacopoeia, European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare. — 2015. — 74 p.).

діапазон застосування, правильність і прецизійність. Це забезпечує ретельне і повне дослідження можливостей аналітичної методики.

2.2. Специфічність

Дослідження специфічності проводиться під час валідації випробувань на ідентифікацію, контроль домішок і кількісне визначення. Спосіб підтвердження специфічності залежить від завдань, для розв'язання яких призначена аналітична методика.

Якщо методика недостатньо специфічна, застосовують поєднання двох або більше аналітичних методик для досягнення необхідного рівня вибірності.

2.2.1. Ідентифікація

Випробування на ідентифікацію мають забезпечувати можливість розрізнити сполуки близької будови, які можуть бути присутні в зразку разом із визначуваним компонентом. Вибірність методики може бути підтверджена одержанням позитивних результатів (можливо, шляхом порівняння з відомим стандартним зразком) для зразків, які містять визначуваний компонент, і негативних— для зразків, які не містять його. Для підтвердження відсутності хибнопозитивних результатів випробування на ідентифікацію може бути перевірене для речовин із близькою будовою або супровідних аналізованих речовині. Вибір потенційно заважальних проведенню випробування речовин має бути обґрунтований і включати обговорення можливого заважального впливу.

2.2.2. Кількісне визначення і випробування на домішки

Під час проведення валідації хроматографічних методик для підтвердження специфічності мають використовуватися характерні хроматограми із зазначенням індивідуальних речовин. Аналогічний підхід використовують і для інших методів розділення.

Для хроматографічних методик ступінь розділення має бути досліджений для відповідних концентрацій речовин. Для підтвердження специфічності може бути використаний ступінь розділення двох речовин, які найближче елюються.

У разі використання неспецифічного методу кількісного визначення необхідно застосовувати додаткові аналітичні методики і підтверджувати специфічність усього комплексу методик. Наприклад, якщо кількісне визначення проводиться

титриметричним методом, то його можна доповнити відповідним випробуванням на домішки.

Для кількісного визначення і для випробувань на домішки застосовують однакові підходи, описані нижче.

2.2.2.1. Зразки домішок наявні

- Для методики кількісного визначення необхідно підтвердити вибірність визначення аналізованої речовини в присутності домішок і/або інших компонентів зразка. Це можна зробити внесенням до зразка (субстанції або лікарського засобу) домішок і/або інших компонентів зразка у відповідній концентрації і подальшим доведенням того, що це не відбилося на одержуваному результаті (шляхом порівняння результатів, одержаних на вихідному і забрудненому зразках).
- Для випробувань на чистоту підтвердження вибірності проводять шляхом забруднення субстанції або готового лікарського засобу відповідними кількостями домішок і доведення розділення цих домішок як одної з одною, так і з іншими компонентами зразка.
- Альтернативно для менш дискримінуючих процедур може бути прийнятним продемонструвати, що домішки визначаються з прийнятною правильністю та прецизійністю.

2.2.2.2. Зразки домішок відсутні

У разі якщо зразки домішок або продуктів розкладу відсутні, підтвердження специфічності проводять шляхом порівняння результатів аналізу зразків, що містять домішки або продукти розкладу, пропонованою методикою й іншою арбітражною методикою. Як остання може бути використана фармакопейна методика або інша валідована методика. Цей підхід передбачає попереднє забруднення зразка продуктами розкладу шляхом витримувannya його у стресових умовах: вплив світла, тепла, вологості, гідролізу, окиснення.

- Під час валідації кількісного визначення треба порівняти результати 2 аналізів (одержані з використанням методики, що валідується, і арбітражної методики).
- Під час валідації випробування на чистоту треба порівняти профілі домішок (одержані з використанням методики, що валідується, і арбітражної методики).

Для доведення того, що пік аналізованої речовини відповідає лише одному компоненту, використовують тести на чистоту піків, наприклад, з діодно-матричним детектуванням, мас-спектрометрією тощо.

2.3. Лінійність

Лінійна залежність має бути досліджена в межах діапазону застосування аналітичної методики (див. розділ 2.4). Вона може бути підтверджена безпосередньо на субстанції (шляхом розведення вихідного розчину) або (для лікарських засобів) на модельних сумішах із використанням відповідної процедури. Остання може бути розроблена під час дослідження діапазону застосування.

За одержаними даними будують графік залежності сигналу як функції концентрації або кількості визначуваного компонента і візуально оцінюють його лінійність. Якщо лінійна залежність спостерігається, то результати обробляють підходящим статистичним методом, наприклад методом найменших квадратів.

У деяких випадках для одержання лінійності дані треба піддати попередньому математичному перетворенню. Мають бути визначені і подані: коефіцієнт кореляції, точка перетину з віссю ординат, тангенс кута нахилу прямої і залишкова сума квадратів відхилень, а також графік з усіма експериментальними даними. Для оцінювання лінійності може знадобитися аналіз відхилень експериментальних даних від прямої.

Деякі аналітичні методики, наприклад імуноаналітичні, не показують лінійності за жодних математичних перетворень. У таких випадках аналітичний відклик має бути описаний підходящою функцією концентрації аналізованої речовини в зразку.

Для підтвердження лінійності використовують не менше п'яти концентрацій. Інші підходи мають бути обґрунтовані.

2.4. Діапазон застосування

Діапазон застосування методики залежить від її призначення і визначається під час вивчення лінійності. У межах діапазону застосування методика має забезпечувати потрібну лінійність, правильність і прецизійність.

Мінімальні допустимі діапазони застосування методик:

- для кількісного визначення лікарських субстанцій або лікарських форм: від 80 % до 120 % від номінального вмісту;

- для визначення домішок: від межі кількісного визначення або від 50 % відносно максимально припустимого вмісту кожної домішки (що є більшим) до 120 %;
- для домішок, які мають надзвичайно високу активність або призводять до токсичного або неочікуваного фармакологічного ефекту, межа виявлення / межа кількісного визначення має бути узгоджена з рівнем, у якому домішки контролюються.

Примітка: якщо валідація проводиться одночасно з розробкою методики, може бути необхідно встановити діапазон застосування в охопленні? нормування, що передбачається.

- Якщо випробування на чистоту та кількісний вміст виконуються сумісно як одне випробування і використовується один розчин порівняння з концентрацією 100 %, лінійність має бути вивчена в діапазоні від межі кількісного визначення або 50 % від максимально припустимого вмісту для кожної домішки (що є більшим) до 120 % від номінального вмісту для кількісного визначення.
- Для однорідності дозування: від 70 % до 130 % від номінального вмісту, якщо для випробування не потрібен ширший інтервал (наприклад, для дозованих аерозолів).
- Для випробувань на розчинення: ± 20 % (абсолютних) від нормованої величини вивільнення. Наприклад, якщо під час контролю вивільнення пролонгованих лікарських засобів нормована величина вивільнення становить від 20 % за першу годину і до 90 % за 24 год, то діапазон застосування має бути від 0 % до 110 % від номінального вмісту.

2.5. Правильність

Правильність вивчають у межах діапазону застосування аналітичної методики.

2.5.1. Кількісне визначення

2.5.1.1. Субстанції

Можуть використовуватися такі способи визначення правильності:

- застосування аналітичної методики до зразка з відомим ступенем чистоти, наприклад до стандартного зразка;

- порівняння результатів аналізу, одержаних із використанням методики, що валідується, і арбітражного методу, правильність і прецизійність якого відомі (використання незалежного методу);
- висновок про правильність робиться за результатами встановлення прецизійності, лінійності і специфічності;

2.5.1.2. Готові лікарські засоби

Можуть використовуватися такі способи визначення правильності:

- застосування методики до модельних сумішей, до яких були додані відомі кількості аналізованої речовини;
- у разі коли неможливо одержати зразки всіх компонентів лікарського засобу, можливе застосування методу добавок або арбітражної методики, правильність якої установлена і доведена (незалежні методика);
- висновок про правильність можна зробити після того, як установлені прецизійність, лінійність і специфічність.

2.5.2. Домішки (кількісний вміст)

Правильність вивчають на зразках (субстанції або готового лікарського засобу) з доданою відомою кількістю домішок.

Якщо домішки або продукти розкладу недоступні, застосовують порівняння результатів, отриманих незалежною методикою. Може використовуватися коефіцієнт перерахунку на субстанцію.

2.5.3. Представлення даних, яке рекомендується

Правильність оцінюють не менш як для дев'яти визначень та не менш ніж для трьох різних концентрацій, що охоплюють увесь діапазон застосування, наприклад: три концентрації і три визначення для кожної.

Правильність виражають у відсотках знайденого значення від уведеної кількості або як різницю між середнім і справжнім значенням з урахуванням відповідних довірчих інтервалів.

2.6. Прецизійність

Валідаційна характеристика «прецизійність» вивчається для методик кількісного визначення основної речовини і методик кількісного визначення домішок.

2.6.1. Збіжність

Збіжність вивчають, виконуючи:

- не менше дев'яти визначень, **що** охоплюють діапазон застосування методики (наприклад, три концентрації / три повтори), або
- не менше шести визначень для зразків із вмістом аналізованої речовини, близьким до номінального.

2.6.2. Внутрішньолабораторна прецизійність

Об'єм вивчення внутрішньолабораторної прецизійності залежить від того, у який спосіб буде використовуватися методика. Заявник має встановити вплив випадкових факторів на прецизійність аналітичної методики, що валідується. Типовими досліджуваними факторами є різні дні, різні аналітики, різне обладнання тощо. Немає потреби вивчати вплив факторів індивідуально, найкраще використовувати планування експерименту.

2.6.3. Відтворюваність

Відтворюваність оцінюють шляхом проведення міжлабораторних досліджень. Відтворюваність має бути вивчена під час стандартизації аналітичної методики, наприклад, для включення її до Фармакопеї. Вивчення відтворюваності не вносять у реєстраційні документи.

2.6.4. Представлення даних, яке рекомендується

Під час вивчення прецизійності мають подаватися: стандартне відхилення, відносне стандартне відхилення (коефіцієнт варіації) і довірчий інтервал для кожного з рівнів досліджуваної прецизійності.

2.7. Межа виявлення

Залежно від того, чи є методика інструментальною чи неінструментальною, для визначення межі виявлення застосовуються різні підходи, які описані нижче. Інші підходи також є прийнятними.

2.7.1. Візуальне оцінювання

Візуальне оцінювання використовують як для неінструментальних, так і для інструментальних методів.

Межу виявлення встановлюють шляхом аналізу зразків із відомими концентраціями аналізованої речовини й оцінюванням мінімального вмісту, за якого аналізована речовина надійно визначається.

2.7.2. Відношення «сигнал/шум»

Цей підхід застосовний тільки до тих методів, для яких спостерігається шум базової лінії. Для визначення співвідношення «сигнал/шум» порівнюють величини сигналів, одержані для контрольного дослідження і для зразків із низькими концентраціями аналізованої речовини. На підставі одержаних даних установлюють мінімальну концентрацію, за якої аналізована речовина може бути надійно виявлена. Зазвичай прийнятним є відношення «сигнал/шум», що становить від 3:1 до 2:1.

2.7.3. Використання стандартного відхилення сигналу і нахилу калібрувальної прямої

Межа виявлення (DL) може бути виражена як:

$$DL = 3.3 \times s / b, \quad (2.1)$$

де s — стандартне відхилення сигналу;

b — тангенс кута нахилу калібрувальної прямої.

Значення тангенса кута нахилу калібрувальної прямої обчислюють із калібрувальної прямої для аналізованої речовини. Оцінювання стандартного відхилення сигналу може бути проведене багатьма способами, наприклад такими.

- *Використання стандартного відхилення сигналу для контрольного дослідження.* Вимірюють аналітичний сигнал для необхідної кількості зразків, що не містять аналізованої речовини, і обчислюють стандартне відхилення.
- *Використання калібрувальної прямої.* Одержують калібрувальну пряму для зразків із вмістом аналізованої речовини, близьким до межі виявлення, і обчислюють її параметри. Як стандартне відхилення s у формулі (2.1) може бути використане залишкове стандартне відхилення лінійної регресії або стандартне відхилення вільного члена лінійної регресії.

2.7.4. Представлення даних, яке рекомендується

Подають значення межі виявлення із зазначенням способу, використаного для його визначення.

Якщо значення межі виявлення одержано шляхом обчислень або екстраполяцій, його оцінка має бути підтверджена аналізом необхідної кількості зразків із вмістом аналізованої речовини, близьким до межі виявлення.

2.8. Межа кількісного визначення

Можливі декілька підходів для визначення межі кількісного визначення, які залежать від того, є методика інструментальною або неінструментальною. Можуть бути використані наведені нижче підходи.

2.8.1. Візуальне оцінювання

Візуальне оцінювання використовують як для неінструментальних, так і для інструментальних методів.

Межу кількісного визначення (МКВ) установлюють шляхом аналізу зразків із відомими концентраціями аналізованої речовини і оцінюванням мінімального вмісту, за якого аналізована речовина визначається кількісно з потрібною правильністю і прецизійністю.

2.8.2. Відношення «сигнал/шум»

Цей підхід застосовний лише до тих методів, для яких спостерігається шум базової лінії (див. п. 7.2). Для визначення співвідношення «сигнал/шум» порівнюють величини сигналів, одержані для контрольного досліду і для зразків із низькими концентраціями аналізованої речовини. На підставі одержаних даних установлюють мінімальну концентрацію, для якої величина відношення «сигнал/шум» становить близько 10:1.

2.8.3. Використання стандартного відхилення сигналу і нахилу калібрувальної прямої

$$QL = 10 \times s / b, \quad (2.2)$$

де

s — стандартне відхилення сигналу;

b — тангенс кута нахилу калібрувальної прямої.

Значення тангенса кута нахилу калібрувальної прямої може бути визначене з калібрувальної прямої для аналізованої речовини. Оцінювання стандартного відхилення сигналу може бути проведене багатьма способами, наприклад такими.

- *Використання стандартного відхилення сигналу для контрольного дослідю.* Вимірюють величину аналітичного сигналу для необхідної кількості зразків, що не містять аналізованої речовини, і обчислюють стандартне відхилення.
- *Використання калібрувальної прямої.* Одержують калібрувальну пряму для зразків із вмістом аналізованої речовини, близьким до межі кількісного визначення, і обчислюють її параметри. Як стандартне відхилення s у формулі (2.2) може бути використане залишкове стандартне відхилення лінійної регресії або стандартне відхилення вільного члена лінійної регресії.

2.8.4. Представлення даних, яке рекомендується

Подають значення межі кількісного визначення із зазначенням способу, використаного для його визначення. Значення межі кількісного визначення має бути підтвержене аналізом необхідного числа необхідної кількості зразків із вмістом аналізованої речовини, близьким до межі кількісного визначення.

2.9. Робасність

Оцінювання робасності проводять на стадії розробки методики з урахуванням типу методики, що вивчається. Це оцінювання має довести надійність результатів аналізу в разі невеликих змін параметрів методики.

Якщо на результати аналізу впливають умови його проведення, ці умови мають бути стандартизовані, і до тексту методики вносять відповідні застереження.

Одним із наслідків оцінювання робасності методики має бути розробка параметрів придатності аналітичної системи (наприклад, вимоги до ступеня розділення), які мають гарантувати, що методика буде давати коректні результати під час будь-якого звичайного використання.

Типові приклади параметрів, які вивчаються:

- стійкість у часі розчинів, які аналізуються;
- різне обладнання;
- різні аналітики.

У разі рідинної хроматографії типовими параметрами, що варіюють, є:

- рН рухомої фази;
- склад рухомої фази;
- колонки (різні серії і/або постачальники);
- температура;
- швидкість рухомої фази.

У разі газової хроматографії:

- колонки (різні серії і/або постачальники);
- температура;
- швидкість газу-носія.

2.10. Перевірка придатності системи

Перевірка придатності системи є складовою частиною багатьох аналітичних методик. Цей тест ґрунтується на уявленні про те, що обладнання, електроніка, аналітичні операції і аналізовані зразки становлять єдину систему, яку можна досліджувати як ціле. Параметри, які вводяться до тесту на перевірку придатності аналітичної системи, залежать від використовуваного методу аналізу (див. Фармакопею).