

УДК 661.12 : 658.562 : 615.07

В.Е. Доброва, Л.Н. Малоштан

*Национальный фармацевтический университет, Харьков*

## **АНАЛИЗ ПРОБЛЕМ ВАЛИДАЦИИ БИОАНАЛИТИЧЕСКИХ МЕТОДИК, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ПРИ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИХ И КЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ**

*В данной работе рассмотрены проблемы валидации аналитических методик, используемых в различных медико-биологических исследованиях. Проведенный анализ современной нормативной базы, затрагивающей вопросы разработки процессов валидации, показал, что в отличие от современных производственных процессов, которые, в большинстве своем, регламентируются и документируются в соответствии с системой Международных стандартов ISO серии 9000, лабораторные исследования проводятся без надлежащей систематизации и стандартизации. Предложены подходы к созданию планов валидации биоаналитических методик.*

***валидация, стандарты, метрологическое обеспечение, медико-биологические исследования, стандарты, биоэквивалентность, хроматография***

Сегодня на Украине отмечается массовое движение по внедрению на фармацевтических предприятиях систем управления качеством в соответствии с требованиями международного стандарта ISO 9001:2000, что способствует улучшению качества продукции повышению ее конкурентоспособности, развитию производства и выходу его на новый европейский уровень.

Национальная техническая нормативная база Украины состоит из более 22 тысяч стандартов, и по количественным показателям полностью соответствует уровню развитых стран, но при этом она недостаточно обновляется и имеет низкий уровень гармонизации с международными нормами. Принятый в Украине Закон «О стандартизации» не распространяется на ЛС. При этом Закон Украины «О лекарственных средствах» не содержит статей, регламентирующих систему стандартизации фармацевтической продукции, а включенные в него нормативные документы не соответствуют требованиям ISO 9001:2000, установленным в ЕС [1,2].

С целью обеспечения качества при производстве лекарственных средств (ЛС) и торговли ими на трех крупнейших рынках мира – европейском, американском и азиатском были приняты принципы и правила надлежащей производственной практики (Good manufacturing practice – GMP). Данные пра-

вила разработаны специально для фармацевтического производства и включают в себя ряд нормативных документов и стандартов, конкретизирующих условия организации, процесса и развития фармацевтического производства [3].

Важной составляющей процедурой, гарантирующей обеспечение качества продукции как на первоначальном этапе – запуске производственных процессов так и при последующих плановых проверках и аттестациях, является валидация.

В ДСТУ ISO 9000-2001 было принято такое определение валидации: «3.8. Термины относительно проверки. 3.8.5 утверждение (validation). Утверждение представлением объективных доказательств, что требования по конкретному предусмотренному использованию или применению выполнены».

В методических указаниях, разработанных в Российской Федерации, приводится следующее определение валидации – «документированная процедура, дающая высокую степень уверенности в том, что конкретный процесс, метод или система будет последовательно приводить к результатам, отвечающим заранее установленным критериям приемлемости» [5].

Большое внимание процедурам и документам, регламентирующим валидацию, уделяют различные

международные организации. Например, Конвенцией по фармацевтическим инспекциям и Системой сотрудничества по фармацевтическим инспекциям вместе с рядом других документов был принят «Основной план валидации, квалификация установки и квалификация работы, валидация процессов производства ...» [6].

На Украине получила хорошее развитие и нормативное закрепление валидация аналитических методов для контроля качества лекарственных средств на предприятиях и в структуре Государственной инспекции по контролю за ЛС [4].

Одним из этапов создания современных лекарственных средств являются доклинические исследования химических субстанций, лежащих в основе разрабатываемого препарата, при проведении которых главным инструментом являются разнообразные медико-биологические методики. Кроме того, эти методики применяются и на дальнейших этапах разработки лекарственного средства, а также при рутинном контроле уже выпускаемых фармацевтической промышленностью препаратов с целью выявления несоответствий и фальсификатов [3, 4].

На сегодняшний день на Украине не существуют нормативных документов касающихся валидации биоаналитических методов, применяемых в доклинических и клинических исследованиях ЛС. В то время как в США валидация биоаналитических методов является обязательным условием использованием их в лабораториях и регламентируется «Правилами...» [7]. Всемирная организация здравоохранения в своих документах и проектах, составленных для национального руководства стран СНГ, так же рекомендует создавать и регламентировать валидационные процедуры для биоаналитических методов.

**Цель данной работы:** разработка мастер-плана валидации биоаналитических методов, применяемых в фармакологических и клинических исследованиях ЛС.

Разработка мастер-плана валидации любого биоаналитического метода состоит из четырех основных аспектов:

- 1) валидация подготовки стандартных образцов;
- 2) полная (первичная) валидация методики;
- 3) валидация аналитической методики в процессе использования;
- 4) кросс-валидация;
- 5) валидация документации.

Каждый из этих аспектов сам по себе представляет процесс, валидация которого требует определенных подходов и решений. Поэтому остановимся на них подробнее.

Для получения достоверных результатов при проведении биоаналитических исследований, прежде всего, должна быть проведена валидация подготовки стандартных образцов (СО) или стандартного

препарата сравнения. Могут применяться СО, полученные тремя способами:

- 1) сертифицированные СО (устанавливаются Государственной фармакопеей);
- 2) тест-системы, предлагаемые производителями;
- 3) СО, методика получения которых разработана самой лабораторией и прошла сертификацию по соответствию и качеству, что документально подтверждено.

При этом должны использоваться растворы известной концентрации, приготовление которых соответствует стандартным требованиям. Химические вещества (базовые растворители СО) должны иметь определенную степень чистоты. Результатом валидации является документальное подтверждение содержания основного вещества в СО. По возможности при проведении биоаналитических исследований следует применять одни и те же СО.

Полная валидация методики это следующий этап. Она проводится в следующих случаях: при разработке биоаналитического метода; при изучении новой лекарственной субстанции; при необходимости подтверждения результатов, полученных с помощью другой методики и выходящих за допустимые пределы. При этом необходимо использовать СО; провести разработку процедуры метода; валидировать и принять для использования в повседневной практике. В качестве базовой процедуры разрабатываемого биоаналитического метода может использоваться:

- хроматографический анализ, например, газовая хроматография, жидкостная хроматография;
- лигандообменные методы, например, изотопное иммунологическое обследование (radioimmunoassay – RIA);
- иммуноферментные методы и др.

Валидация метода должна включать определение следующих параметров:

- точность;
- чувствительность;
- специфичность (селективность);
- устойчивость;
- стабильность;
- правильность.

Для каждого из них должна быть рекомендована своя процедура оценки (минимально возможное число проб, их концентрации, число параллельных определений, допустимые отклонения). Среднее значение критерия приемлемости (допустимости) и воспроизводимости применяемых методик не должно быть хуже 15% (для предела обнаружения 20%).

На начальном этапе эксперимента должна быть создана калибровочная кривая и проведено внедрение достаточного количества калибровочных стандартов:

- обычно 6 – 8 стандартов, отличных от нуля;
- «чистый» образец;
- нулевой образец;
- нижний предел чувствительности обнаружения количественных колебаний.

Точность – степень близости между установленной и истинной оценками.

Специфичность (селективность) – способность метода измерить только то, что предусмотрено для измерения, в присутствии других составляющих образца.

Чистый образец биологической среды следует исследовать на предмет пересекающихся помех определения концентрации.

Устойчивость – определительная эффективность аналитического процесса, выраженная в долевом соотношении к известному количеству анализируемого вещества, достигается с помощью отбора образцов и последующих шагов метода. Устойчивость не должна быть 100%-ой, но уровень устойчивости аналитического метода должен соответствовать внутреннему стандарту.

Стабильность метода предусматривает:

- стабильность анализа биологических сред;
- отбор образцов;
- хранение образцов;
- анализ образцов;
- стабильность при замораживании;
- краткосрочная стабильность;
- долгосрочная стабильность;
- стабильность после приготовления;
- стабильность растворов при хранении.

Кроме того, должны быть выполняются требования по точности разбавления:

- подтвердить способность образцов к разбавлению, превышающему верхний предел чувствительности (обнаружения);
- предел количественного анализа (LOQ);
- правильность и точность.

Для оценки каждого из этих параметров выбирается соответствующий метод, заранее фиксируемый в протоколе валидации. Результаты обрабатываются с помощью соответствующих статистических методов.

Анализ медико-биологических образцов должен проводиться в соответствии со следующими требованиями:

- однократное определение калибровочных стандартов;
- калибровочная кривая для каждого раунда анализа;
- экстраполяция выше или ниже калибровочного уровня не допускается.

На завершающем этапе полной валидации метода необходимо осуществить контроль качества и

валидацию документации. Контроль качества включает в себя определение вещества не менее чем в трех пробах различной концентрации:

- низкая концентрация;
- средняя концентрация;
- высокая концентрация.

Валидация документации предусматривает разработку четких СОПов и критериев приемлемости, а также полное письменное описание СОПов:

- ♦ ведение учета;
- ♦ обеспечение безопасности;
- ♦ цепочка обеспечения выборки;
- ♦ ремонт выборки;
- ♦ аналитические инструменты;
- ♦ процедуры для контроля качества и верификации результатов.

В случае если произошли изменения в инструментальном/программном обеспечении исследования или в процессе статистической обработки результатов, необходимо провести частичную валидацию биоаналитической методики. Процедура обмена методиками между лабораториями должна сопровождаться кросс-валидацией.

Предложенный мастер-план валидации биоаналитической методики является обобщенным. В Проблемной лаборатории морфофункциональных исследований Национального фармацевтического университета проводится валидация ряда медико-биологических методик в соответствии с разработанным и конкретизированным мастер-планом.

## Список литературы

1. Закон України «Про стандартизацію» // *Відомості Верховної Ради (ВВР)*. – 2001. – № 31. – С. 145.
2. Закон України «Про лікарські засоби» // *Відомості Верховної Ради (ВВР)*. – 1999. – № 70/97. – С. 27.
3. Державна фармакопея України/ Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». – 1-е вид. – Х.: РЕПІГ, 2001. – 556 с.
4. Гризодуб А.И., Сур С.В. Проблемы качества и фальсификации лекарственных средств // *Аптека*. – 2007. – № 20. – С. 294.
5. Производство лекарственных средств. Валидация. Основные положения. Методические указания – М.: Ремедиум, 2001. – 16 с.
6. *Guide to Good Manufacturing Practice for Medicinal Products*. // U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Rockville, Maryland, September 2004.
7. *Guidance for Industry. Bioanalytical Method Validation*. // Center for Drug Evaluation and Research, U.S. Food and Drug Administration, U.S. Department of Health and Human Services, Rockville, Maryland, May 2001.

*Поступила в редколлегию 30.04.2007*

**Рецензент:** д-р техн. наук, ст. научн. сотр. Ю.П. Мачехин, Харьковский национальный университет радиоэлектроники, Харьков.