



**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

**РЕСПУБЛИКАНСКОЕ УНИТАРНОЕ ПРЕДПРИЯТИЕ  
«ЦЕНТР ЭКСПЕРТИЗ И ИСПЫТАНИЙ В ЗДРАВООХРАНЕНИИ»**

## **Особенности валидации ВЭЖХ-методик количественного определения**

**Агабалаев Александр Андреевич**

**Заместитель заведующего лаборатории фармакопейного и фармацевтического анализа,**

**кандидат химических наук**

**2024**

**ICH guideline M10 on bioanalytical method validation:**

**«Валидация – демонстрация того, что биоаналитическая методика подходит для намеченной цели»**

**Решение Коллегии Евразийской экономической Комиссии от 17 июля 2018 г. № 113:**

**«Целью валидации аналитической методики проведения испытаний лекарственных средств является документированное подтверждение ее пригодности для целевого назначения»**



**Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. № 85:**

**«Основной целью валидации биоаналитической методики является подтверждение ее надежности для определения концентрации анализируемого вещества в таких биологических образцах, как кровь, сыворотка, плазма, моча и слюна».**

**«Любая биоаналитическая методика, независимо от того новая она или известная, подлежит полной валидации».**

## Решение Коллегии Евразийской экономической Комиссии от 17 июля 2018 г. № 113

Валидационная характеристика	Тип аналитической методики			
	испытания на идентификацию (подлинность)	испытания на примеси		количественные испытания
		количественное содержание	предельное содержание	растворение (только измерение), содержание (активность)
Правильность	–	+	–	+
Прецизионность повторяемость	–	+	–	+
Промежуточная прецизионность	–	+*	–	+*
Специфичность**	+	+	+	+
Предел обнаружения	–	–***	+	–
Предел количественного определения	–	+	–	–
Линейность	–	+	–	+
Диапазон применения	–	+	–	+

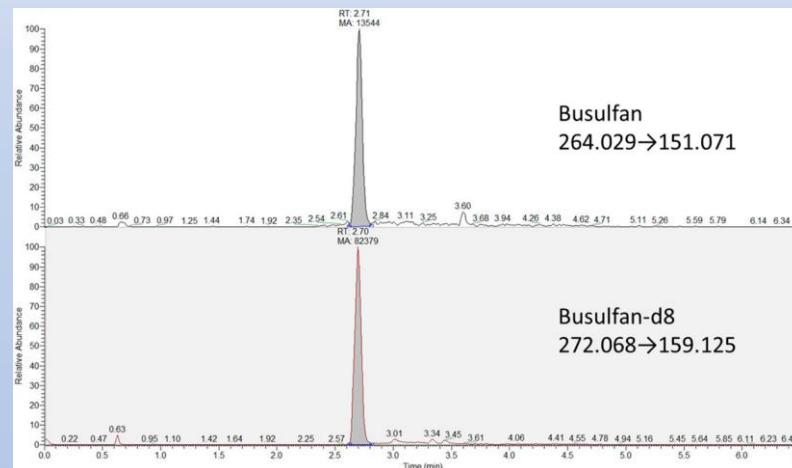
## Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. № 85

Основными характеристиками биоаналитической методики, необходимыми для подтверждения ее приемлемости и надежности аналитических результатов, являются:

- селективность,
- нижний предел количественного определения,
- функция отклика и аналитический диапазон (воспроизводимость параметров градуировочной кривой),
- правильность,
- прецизионность,
- влияние матрицы (эффекты матрицы (полнота элюирования)),
- стабильность анализируемых веществ в биологических образцах и стабильность анализируемого вещества (веществ) и внутреннего стандарта при хранении, в рабочих растворах, в извлечениях в течение всего периода хранения и пробоподготовки

**Решение Совета Евразийской  
экономической комиссии от 3 ноября  
2016 г. № 85**

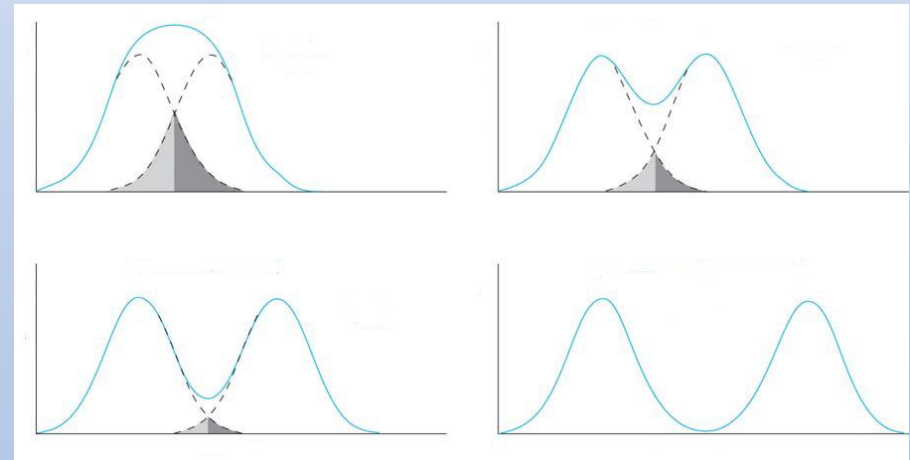
**При применении в качестве биоаналитического  
метода масс-спектрометрии по возможности  
следует использовать стабильные меченные  
изотопом внутренние стандарты (ВС).**



## Селективность (избирательность)

**Селективность (selectivity) - способность биоаналитической методики определять и различать исследуемое анализируемое вещество и внутренний стандарт в присутствии компонентов, которые могут содержаться в образце**

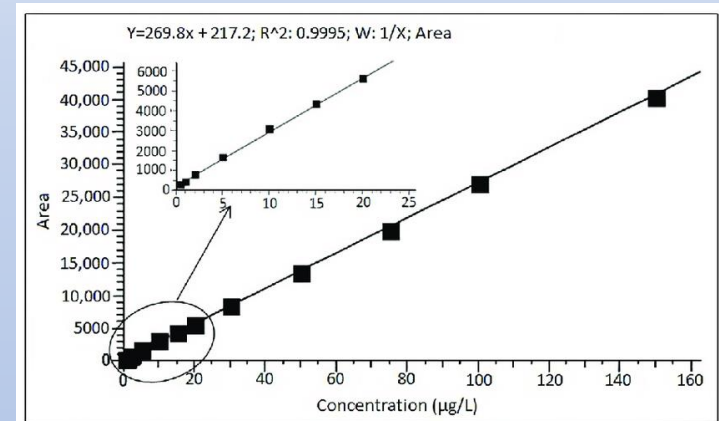
**Биоаналитическая методика должна обладать способностью дифференцировать анализируемое вещество и внутренний стандарт от эндогенных компонентов матрицы и других компонентов образца.**



**Специфичность (specificity) - способность биоаналитической методики однозначно определять анализируемое вещество в присутствии других соединений (эндогенных или экзогенных) в биологическом образце.**

## Градуировочная кривая (линейность)

Необходимо оценить функцию отклика градуировочной кривой для всех концентраций анализируемого вещества, при этом изучению подлежит определенный диапазон концентраций.



В идеале до начала проведения валидации биоаналитической методики необходимо установить ожидаемый диапазон концентраций.

...

Диапазон необходимо задать с целью надлежащего описания фармакокинетики изучаемого анализируемого вещества.

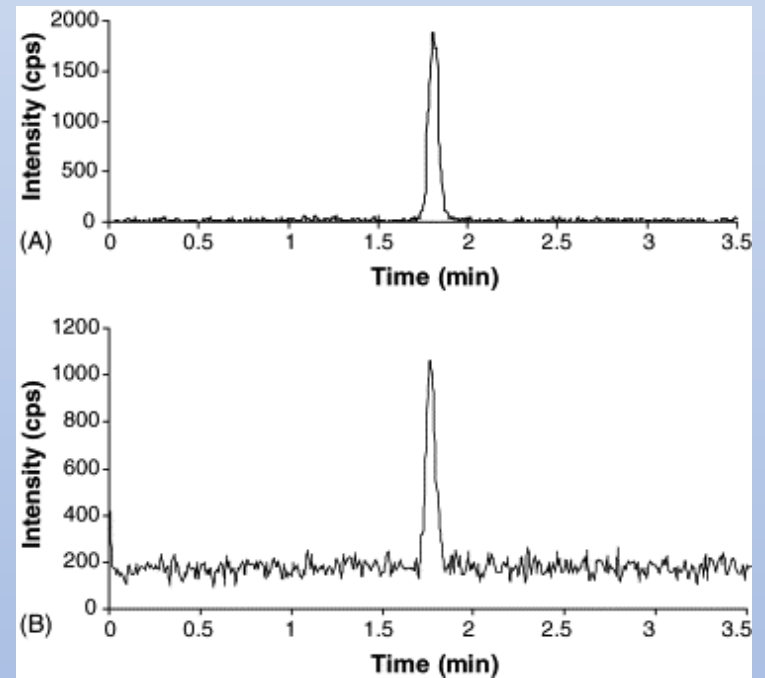
## **Нижний предел количественного определения**

**Нижний предел количественного определения (НПКО) есть наименьшая концентрация анализируемого вещества в образце, которая поддается надежному количественному определению с приемлемой правильностью и прецизионностью. НПКО считается наименьшим градуировочным стандартным образцом. При этом сигнал анализируемого вещества из образца с НПКО должен не менее чем в 5 раз превосходить величину сигнала холостого образца. НПКО необходимо адаптировать к ожидаемым концентрациям и цели исследования (например, в исследовании биоэквивалентности НПКО не должен быть выше, чем 5% от  $S_{max}$  (минимальной величины  $S_{max}$  из всей выборки субъектов))**



## Влияние (эффект) переноса

При разработке методики необходимо принимать во внимание и минимизировать перенос анализируемого вещества от пробы к пробе. В процессе валидации необходимо оценить эффект переноса, вводя холостые образцы после образцов с высокой концентрацией или градуировочных растворов верхних уровней количественного определения.



## Правильность

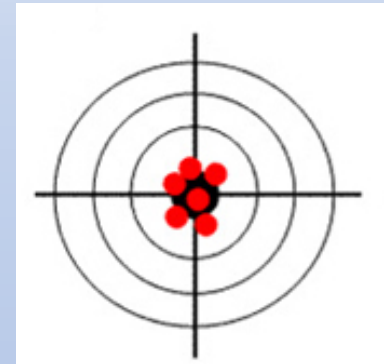
Правильность аналитической методики выражает близость полученных с помощью нее значений к номинальным концентрациям анализируемого вещества (как правило, она выражается в процентах).

Образцы для контроля качества КК готовят независимо от градуировочных стандартов, используя различные предварительно приготовленные исходные растворы.

Правильность необходимо определять по концентрациям образцов для КК, получаемым как внутри 1 цикла (правильность внутри цикла), так и в разных циклах (правильность между циклами).

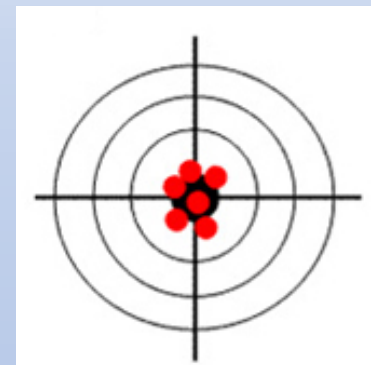
Рекомендуемые концентрации:

- 1) НПКО;
- 2) тройная величина НПКО (нижний уровень);
- 3) около 30 - 50% от верхней границы определяемых концентраций (средний уровень);
- 4) не менее 75% от верхней границы определяемых концентраций (верхний уровень).



## Прецизионность

Прецизионность аналитической методики - это степень близости результатов между отдельными повторными измерениями, выражающаяся в виде относительного стандартного отклонения (коэффициента вариации). Прецизионность необходимо подтвердить для НПКО, нижнего, среднего и верхнего уровней концентрации образцов для КК как внутри 1 цикла, так и между разными циклами, то есть для тех же циклов и данных, что и при подтверждении правильности.

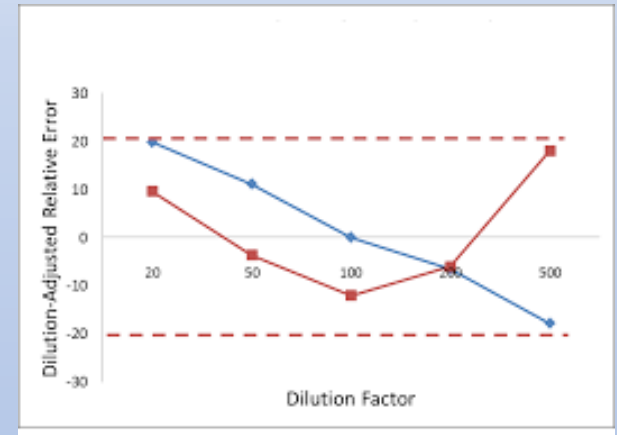


При оценке прецизионности внутри цикла необходимо использовать не менее 5 образцов одной концентрации для НПКО, нижнего, среднего и верхнего уровней концентрации образцов для КК внутри одного цикла.

При оценке прецизионности между циклами необходимо определить НПКО, нижний, средний и верхний уровни концентраций образцов для КК не менее чем из 3 проанализированных циклов, проведенных в течение не менее чем 2 различных дней.

## Отсутствие влияния разбавления образцов

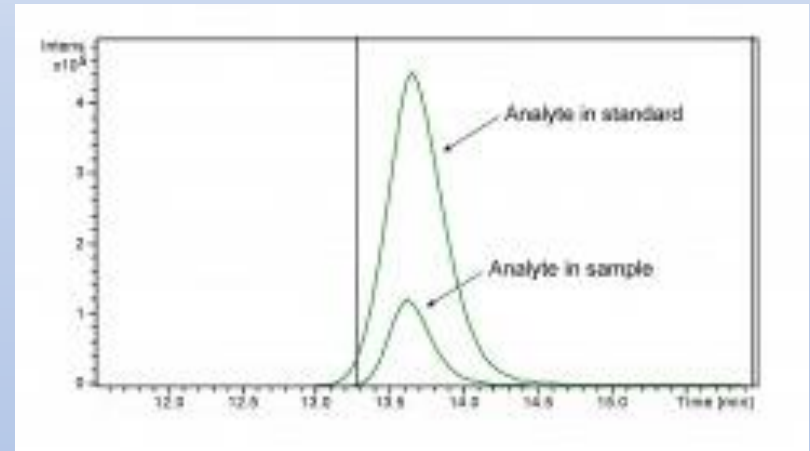
Степень разбавления образцов не должна влиять на параметры правильности и прецизионности методики. По возможности валидацию разбавления образцов необходимо проводить путем добавления к матрице анализируемого вещества в концентрации выше верхней границы определяемых концентраций и разведения полученного образца холостой пробой (не менее 5 определений на каждое разбавление).



## Эффект матрицы

При применении МС-методик необходимо оценить эффект матрицы, используя не менее 6 серий холостых образцов от разных субъектов (источников).

Путем вычисления отношения максимальной площади пика в присутствии матрицы (определяется путем анализа подготовленного холостого образца с добавленной известной концентрацией анализируемого вещества) к максимальной площади пика в отсутствие матрицы (чистый раствор анализируемого вещества в той же концентрации) для каждой серии матрицы для всех анализируемых веществ и ВС необходимо рассчитать эффект матрицы.



## Стабильность

Необходимо провести следующие испытания стабильности:

а) стабильность исходных и рабочих растворов анализируемого вещества и ВС;

б) стабильность замороженного и размороженного биологического образца, содержащего анализируемое вещество (перемещенного из условий заморозки в комнатную температуру или температуру условий пробоподготовки не менее чем в 3 циклах «замораживания – размораживания»);

в) краткосрочная стабильность анализируемого вещества в биологическом образце при комнатной температуре или температуре условий пробоподготовки;

г) естественное хранение биологического образца, содержащего анализируемое вещество (в замороженном виде).

Кроме того необходимо провести следующие испытания (если применимо):

а) стабильность образца после пробоподготовки при комнатной температуре или в условиях хранения, которые будут использоваться во время анализа;

б) стабильность подвергшихся пробоподготовке образцов в устройстве для автоматического ввода пробы при температуре инжектора или автодозатора.



## Стабильность

**ICH guideline M10 on bioanalytical method validation:**

**Воспроизводимость повторной инъекции**

оценивается путем повторных инъекций КК и обычно включается в оценку прецизионности и правильности. Однако, если образцы могут быть введены повторно (например, в случае перебоев в работе прибора или по другим причинам, таким как отказ оборудования), должна быть оценена воспроизводимость повторной инъекции, чтобы установить жизнеспособность обработанных образцов и обосновать их хранение до повторной инъекции.



**Решение Коллегии Евразийской экономической Комиссии от 17 июля 2018 г. № 113  
«Об утверждении Руководства по валидации аналитических методик проведения испытаний  
лекарственных средств»**

**устойчивость (робастность) (robustness) - способность аналитической методики быть устойчивой к влиянию небольших задаваемых изменений в условиях проведения испытания, которая указывает на ее надежность при обычном (стандартном) использовании.**

**Общими вариациями параметров являются:**

- **стабильность растворов, используемых в аналитических методиках;**
- **время экстрагирования.**

**Параметрами вариации для жидкостной хроматографии являются:**

- **изменение рН подвижной фазы;**
- **изменение состава подвижной фазы;**
- **разные колонки (разные серии и поставщики);**
- **температура;**
- **скорость подвижной фазы (скорость потока).**



**Спасибо за внимание!**