

УДК 615.074:543.544

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ВАЛИДАЦИИ В ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ
НА ПРИМЕРЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПРИМЕСЕЙ В СПИРТЕ ЭТИЛОВОМ****¹Свечкарь В.П., ¹Буданова Н.А., ²Григорьева И.В., ¹Пирогова И.М.**¹ГБУ РО «Центр по сертификации и контролю качества лекарственных средств», Рязань,
e-mail: fcentr@gmail.com;²ГБОУ ВПО РязГМУ Минздрава России, Рязань, e-mail: i.grigorieva@rzgmu.ru

Представлено понятие валидации и ее метрологических характеристик, приведены формулы расчета прецизионности и описана возможность использования методов валидации в фармацевтической практике на примере анализа примесей в спирте этиловом методом газовой хроматографии. Приведены и обобщены результаты анализа спирта этилового на содержание в нем спирта метилового и других токсических микропримесей (пропанола-2) в условиях Испытательной контрольно-аналитической лаборатории ГБУ РО «Центр по сертификации и контролю качества лекарственных средств». Пригодность метода для оценки качества спирта этилового 95% подтверждена характеристикой «прецизионность», которая включает два показателя – повторяемость и воспроизводимость. Результатом проведенных анализов является разработка Стандартной операционной процедуры «Валидация газохроматографического метода испытаний спирта этилового 95%».

Ключевые слова: валидация, прецизионность, повторяемость, воспроизводимость, этиловый спирт, контроль качества

**THE USE OF VALIDATION IN PHARMACEUTICAL PRACTICE FOR EXAMPLE,
DETERMINATION OF IMPURITIES IN ETHYL ALCOHOL****¹Svechkar V.P., ¹Budanova N.A., ²Grigorieva I.V., ¹Pirogova I.M.**¹GBU RO «Center for certification and quality control of pharmaceuticals», Ryazan,
e-mail: fcentr@gmail.com;²HBO HPE Ryazgmu Ministry of health of Russia, Ryazan, e-mail: i.grigorieva@rzgmu.ru

Presents the concept of validation and its metrological characteristics, are given formula for calculating precision and described the use of validation methods for pharmaceutical practice on the example of analysis of impurities in the ethyl alcohol by gas chromatography. Are given and summarized the results of the analysis of ethyl alcohol on the content of methyl alcohol and other toxic trace contaminants (propanol-2) in test analytical laboratory «Center for certification and quality control of medicines». The suitability of the method for assessing the quality of ethyl alcohol 95% was confirmed by the characteristic «precision», which includes two indicators – repeatability and reproducibility. The result of this analysis is to develop a standard operating procedure «Validation of gas chromatographic test method of 95% ethyl alcohol».

Keywords: validation, precision, repeatability, reproducibility, ethyl alcohol, quality control

Валидация в соответствии с Правилами GMP – это действия, которые доказывают, что определенная методика, процесс, оборудование, сырье, деятельность или система действительно приводят к ожидаемым результатам [5].

Согласно российского стандарта ГОСТ Р ИСО 9000-2008, понятие валидация определена как подтверждение посредством представления объективных свидетельств того, что требования, предназначенные для конкретного использования или применения, выполнены [4].

Основой для проведения процедуры валидации служат методы статистической обработки результатов анализа, достаточно популярно изложенные применительно к области фармации в ряде публикаций [1, 6], на которые и опираются авторы данной статьи.

Валидация метода контроля качества – это процесс установления характеристик метода, показателей его эффективности и определения его ограничений [6]. Главной задачей валидации аналитической методики является экспериментальное доказательство того, что данная методика пригодна для до-

стижения тех целей, для которых она предназначена. При валидации аналитических методов в фармации в основном используют такие метрологические характеристики, как прецизионность, точность, воспроизводимость, повторяемость, правильность, чувствительность, устойчивость, линейность.

Основной характеристикой аналитических методик для количественного определения лекарственных средств и количественной оценки примесей является прецизионность.

Прецизионность является общим термином для выражения изменчивости повторяющихся измерений. Согласно ГОСТ прецизионность – это степень близости друг к другу независимых результатов измерений, полученных в конкретных регламентированных условиях [3].

Прецизионность аналитической процедуры выражает близость значений (степень разброса) между сериями измерений, полученных в результате многократного анализа одного и того же образца при заданных условиях.

Она выражается как коэффициент вариации в % (относительное стандартное от-

клонение, %RSD) для статистически значимого количества образцов ($n \geq 10$).

$$\%RSD = S/\bar{x} \cdot 100\% , \quad (1)$$

где S – среднееквадратическое отклонение экспериментальных величин, \bar{x} – концентрация анализируемого вещества (среднее значение).

Среднееквадратическое отклонение от среднего (стандартное отклонение выборки, S) является мерой рассеяния (дисперсии) результатов измерений и рассчитывается по формуле (2):

$$S = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} , \quad (2)$$

где x_i – результат эксперимента.

В измерениях принято использовать несколько типов прецизионности, в частности таких, как: повторяемость (сходимости, r) и воспроизводимость (R) результатов.

Повторяемость выражает прецизионность при одинаковых рабочих условиях на протяжении короткого промежутка времени, то есть является мерой прецизионности при выполнении ряда условий:

- работает один и тот же исследователь,
- используется один и тот же прибор,
- используется один и тот же метод,
- анализы выполняются в течение короткого промежутка времени,
- используется идентичный объект испытания,
- исследования проводятся в одной и той же лаборатории.

Мерой повторяемости является стандартное отклонение повторяемости (S_r) и предел повторяемости (r). Предел повторяемости (сходимости) – это значение, которое с доверительной вероятностью 95% не превышает абсолютной величиной разности между результатами двух измерений (или испытаний), полученными в условиях повторяемости (сходимости).

$$r = f \cdot \sqrt{2} \cdot S_r = 2,77 S_r , \quad (3)$$

где f – коэффициент критического диапазона.

Величина f (коэффициент критического диапазона) зависит от доверительного уровня вероятности и закона распределения случайной величины. Для пределов воспроизводимости и повторяемости доверительный уровень вероятности составляет 95%, и в ГОСТ Р ИСО 5725 делается допущение, что лежащее в основе распределение является приближенно нормальным. Для нормального распределения на уровне вероятности 95% коэффициент равен 1,96 [3].

Воспроизводимость результатов выражает прецизионность, оцененную по результатам, полученным разными исследова-

телями (внутрилабораторная) или в разных лабораториях (межлабораторная) при выполнении ряда условий:

- работают разные исследователи,
- используется один и тот же метод,
- используется идентичный объект испытания,
- исследования проводятся в одной и той же (внутрилабораторная) или разных лабораториях.

При внутрилабораторных испытаниях прецизионности наблюдения осуществляются в одной и той же лаборатории, но при этом один или несколько факторов – «время», «оператор» или «оборудование» – могут меняться. При установлении прецизионности метода измерений очень важно точно определить соответствующие условия наблюдения, т.е. должны ли быть три вышеупомянутых фактора неизменными или нет. Внутрилабораторные испытания в различные моменты времени учитывают влияние изменения условий окружающей среды и перекалибровки оборудования между наблюдениями. Если в условиях повторяемости наблюдения осуществляются при неизменности всех внутрилабораторных факторов, то в условиях воспроизводимости эти факторы наоборот изменчивы. Если наблюдения выполняются в различных лабораториях, проявляются дополнительные эффекты, являющиеся следствием различия между лабораториями (в административном управлении, материально-техническом обеспечении, проверке стабильности наблюдений и т.д.).

Мерой воспроизводимости является стандартное отклонение воспроизводимости (S_R) и предел воспроизводимости ($R = 2,77 S_R$).

Необходимость рассмотрения прецизионности по ГОСТ Р ИСО 5725-2002 [3] возникает из-за того, что измерения, выполняемые на предположительно идентичных материалах, при предположительно идентичных обстоятельствах, не дают, как правило, идентичных результатов. Это объясняется неизбежными случайными погрешностями, присущими каждой измерительной процедуре, а факторы, оказывающие влияние на результат измерения, не поддаются полному контролю. При практической интерпретации результатов измерений эта изменчивость должна учитываться. Различия между результатами измерений, выполняемых разными операторами и/или с использованием различного оборудования, как правило, будут больше, чем между результатами измерений, выполняемых в течение короткого интервала времени одним оператором с использованием одного и того же оборудования.

Как применяются методы валидации в фармацевтическом анализе, можно проанализировать на примере анализа спирта этило-

вого, который осуществляется в соответствии с ГОСТ Р 51698-2000, изм.1 «Газохроматографический экспресс-метод определения содержания токсичных микропримесей» [2].

Целью исследования является:

– доказательство пригодности метода для оценки качества лекарственных средств в соответствии с требованиями нормативных документов в условиях Испытательной контрольно-аналитической лаборатории ГУЗ «Центр сертификации и контроля качества лекарственных средств Рязанской области»;

– определение характеристики прецизионности, которая включает два показателя: повторяемость и воспроизводимость;

– разработка Стандартной операционной процедуры (СОП) «Валидация газохроматографического метода испытаний спирта этилового 95 %».

Газохроматографический метод применяется для анализа летучих веществ, либо веществ, которые могут быть переведены в парообразное состояние. В газовом хроматографе происходит разделение токсических микропримесей, содержащихся в спирте этиловом и последующее их детектирование пламенно-ионизационным детектором. В нашем случае применяется метод абсолютной градуировки, основанный на предварительном определении за-

висимости между количеством введенного вещества и площадью пика на хроматограмме. Полученная хроматограмма служит основой для качественного и количественного анализа токсических микропримесей в спирте этиловом.

Определение показателя «Повторяемость» выполняется одним провизором-аналитиком путем анализа 10 проб одного и того же образца трех серий спирта этилового 95 %.

Определение показателя «Воспроизводимость» оценивается по результатам анализов, выполненными параллельно двумя провизорами-аналитиками путем анализа 10 проб одного и того же образца трех серий спирта этилового 95 %.

Для примера приведены результаты испытания одной серии спирта этилового одним аналитиком по количественному содержанию метанола (табл. 1) и пропанола-2 (табл. 2) в анализируемом образце. По результатам испытаний проведен расчет среднеквадратичного отклонения (S_r) и коэффициента вариации (%RSD). Результаты остальных испытаний по показателю повторяемости сведены в табл. 3. Результаты испытаний по показателю воспроизводимости сведены в табл. 4, по результатам испытаний проведен расчет среднеквадратичного отклонения (S_R) и коэффициента вариации (%RSD).

Таблица 1

Результаты анализа одного образца этилового спирта 95 % на содержание метанола, проведенные одним провизором-аналитиком

№ анализа	Содержание метанола, об. %, x_i	$x_i - \bar{x}$	$(x_i - \bar{x})^2$
1	$1,8275 \cdot 10^{-3}$	$-0,0395 \cdot 10^{-3}$	$0,00156 \cdot 10^{-6}$
2	$1,8444 \cdot 10^{-3}$	$0,0226 \cdot 10^{-3}$	$0,000511 \cdot 10^{-6}$
3	$1,7779 \cdot 10^{-3}$	$0,089 \cdot 10^{-3}$	$0,007921 \cdot 10^{-6}$
4	$1,9315 \cdot 10^{-3}$	$-0,0645 \cdot 10^{-3}$	$0,00416 \cdot 10^{-6}$
5	$1,8158 \cdot 10^{-3}$	$0,0512 \cdot 10^{-3}$	$0,002621 \cdot 10^{-6}$
6	$1,9028 \cdot 10^{-3}$	$-0,0358 \cdot 10^{-3}$	$0,001282 \cdot 10^{-6}$
7	$1,986 \cdot 10^{-3}$	$-0,119 \cdot 10^{-3}$	$0,014161 \cdot 10^{-6}$
8	$1,8702 \cdot 10^{-3}$	$-0,0032 \cdot 10^{-3}$	$0,00001 \cdot 10^{-6}$
9	$1,8275 \cdot 10^{-3}$	$0,0395 \cdot 10^{-3}$	$0,00156 \cdot 10^{-6}$
10	$1,8670 \cdot 10^{-3}$	$-0,019 \cdot 10^{-3}$	$0,000361 \cdot 10^{-6}$

$$\bar{x} = 1,8670 \cdot 10^{-3}$$

$$\sum (x_i - \bar{x})^2 = 0,034147 \cdot 10^{-6}$$

$$S_r = \frac{\sqrt{0,034147 \cdot 10^{-6}}}{9} = 0,0616 \cdot 10^{-3}$$

$$\%RSD = \frac{100 \cdot 0,0616 \cdot 10^{-3}}{1,8670 \cdot 10^{-3}} = 3,3\%$$

Заключение: коэффициент вариации (%RSD) для 10 измерений по метанолу составил 3,3 %, что соответствует требованиям ГОСТ (не более 5 %) [3].

Таблица 2

Результаты анализа одного образца этилового спирта 95 % на содержание пропанола-2, проведенные одним провизором-аналитиком

№ анализа	Содержание пропанола-2, мг/дм ³ , x_i	$x_i - \bar{x}$	$(x_i - \bar{x})^2$
1	$2,88 \cdot 10^{-4}$	$0,12 \cdot 10^{-4}$	$0,014 \cdot 10^{-8}$
2	$2,82 \cdot 10^{-4}$	$0,06 \cdot 10^{-4}$	$0,003 \cdot 10^{-8}$
3	$2,68 \cdot 10^{-4}$	$-0,085 \cdot 10^{-4}$	$0,007 \cdot 10^{-8}$
4	$2,6 \cdot 10^{-4}$	$-0,16 \cdot 10^{-4}$	$0,025 \cdot 10^{-8}$
5	$2,77 \cdot 10^{-4}$	$0,008 \cdot 10^{-4}$	$0,00006 \cdot 10^{-8}$
6	$2,8 \cdot 10^{-4}$	$0,066 \cdot 10^{-4}$	$0,004 \cdot 10^{-8}$
7	$2,79 \cdot 10^{-4}$	$0,028 \cdot 10^{-4}$	$0,00008 \cdot 10^{-8}$
8	$2,84 \cdot 10^{-4}$	$0,077 \cdot 10^{-4}$	$0,006 \cdot 10^{-8}$
9	$2,66 \cdot 10^{-4}$	$0,097 \cdot 10^{-4}$	$0,009 \cdot 10^{-8}$
10	$2,75 \cdot 10^{-4}$	$0,01 \cdot 10^{-4}$	$0,00009 \cdot 10^{-8}$

$$\bar{x} = 2,76 \cdot 10^{-4}$$

$$\sum (x_i - \bar{x})^2 = 0,07 \cdot 10^{-8}$$

$$S_r = \frac{\sqrt{0,07 \cdot 10^{-8}}}{9} = 0,09 \cdot 10^{-4}$$

$$\%RSD = \frac{100 \cdot 0,09 \cdot 10^{-4}}{2,76 \cdot 10^{-4}} = 3,2\%$$

Заключение: коэффициент вариации (RSD) для 10 измерений по содержанию пропанола-2 составил 11,6%, что соответствует требованиям ГОСТ (не более 5%) [3].

Таблица 3

Результаты расчета по показателю «повторяемость» (сходимость) испытаний по каждой из серий спирта этилового 95 % по содержанию метанола и пропанола-2

условный № серии	№ аналитика	%RSD по содержанию метилового спирта	%RSD по содержанию других токсических микропримесей
1	1	3,3	4,6
2	1	4,9	5,0
3	1	4,8	2,9
1	2	4,7	4,2
2	2	3,5	4,8
3	2	2,4	3,2

Заключение: коэффициенты вариации (RSD) по метилому спирту и по содержанию других токсических микропримесей соответствует ГОСТ (не более 15%) [3].

Аналогично произведен расчет по содержанию пропанола-2, коэффициент вариации (%RSD) составил 5,79% что соответствует требованию ГОСТ – должен быть не более 7% [3].

Из результатов испытаний, проведенных двумя аналитиками в одной и той же лаборатории на одном и том же приборе, следует, что показатели повторяемости

(сходимости) и воспроизводимости не превышают указанные пределы, установленные ГОСТ.

Повторная валидация обычно проводится при изменении условий проведения метода и по истечении определенного промежутка времени, в данном случае организация установила срок проведения повторной плановой валидации через пять лет.

Таблица 4

Результаты расчета по показателю «воспроизводимость» по одной из серий спирта этилового 95% по содержанию метанола

Испытатель	Содержание спирта метилового, % (среднее из 10 анализов), \bar{x}	$x_i - \bar{x}$	$(x_i - \bar{x})^2$
Аналитик № 1	$1,867 \cdot 10^{-3}$	$-0,005 \cdot 10^{-3}$	$0,000025 \cdot 10^{-6}$
Аналитик № 2	$1,877 \cdot 10^{-3}$	$0,005 \cdot 10^{-3}$	$0,000025 \cdot 10^{-6}$

$$\bar{x} = 1,8720 \cdot 10^{-3}$$

$$\sum (x_i - \bar{x})^2 = 0,00005 \cdot 10^{-6}$$

$$S_R = \frac{\sqrt{0,00005 \cdot 10^{-6}}}{1} = 0,00707 \cdot 10^{-3}$$

$$\%RSD = \frac{100 \cdot 0,00707 \cdot 10^{-3}}{1,8720 \cdot 10^{-3}} = 0,38\%$$

Заключение: коэффициент вариации (%RSD) составил по метанолу 0,38%, что соответствует требованию ГОСТ – должен быть не более 6% [3].

Выводы

Пригодность метода для оценки качества спирта этилового 95% в соответствии с требованиями нормативных документов (ОФС) в условиях Испытательной контрольно-аналитической лаборатории ГУЗ «Центр сертификации и контроля качества лекарственных средств Рязанской области» подтверждена характеристикой «Прецизионность», которая включает два показателя – повторяемость и воспроизводимость. Разработана Стандартная операционная процедура (СОП) «Валидация газожидкостного метода испытаний спирта этилового 95%», обеспечивающая надежность результатов и пригодная для целей определения качества спирта этилового.

Список литературы

1. Руководство по инструментальным методам исследований при разработке и экспертизе качества лекарственных препаратов / под ред. Быковского С.Н. проф. д.х.н. Василенко И.А., к.м.н. Харченко М.И., к.фарм.н. Белова А.Б.,

к.фарм.н. Шохина И.Е., к.п.н. Дориной Е.А. – М., Изд-во «Перо», 2014. – С. 27–124, 588–600.

2. ГОСТ Р 51698-2000, изменение № 1 к ГОСТ Р 51698-2000 Водка и спирт этиловый. Газохроматографический метод определения содержания токсичных микропримесей. – М., 2005.

3. ГОСТ Р ИСО 5725-2002 ч. 1–6 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. – М., 2009.

4. ГОСТ Р ИСО 9000-2008. Системы менеджмента качества. Основные положения и словарь. ISO 9000:2005 Quality management systems – Fundamentals and vocabulary. – М.: Стандартинформ, 2009.

5. Руководство Правила надлежащего производства лекарственных средств для медицинского применения и для ветеринарного применения Таможенного союза (правила надлежащей производственной практики – Good Manufacturing Practice – GMP) Режим доступа: http://www.aipm.org/upfile/doc/AIPM-GMP_Feb-01-2013.pdf.

6. Фармацевтическая разработка: концепция и практические рекомендации. Научно-практическое руководство для фармацевтической отрасли / под ред. Быковского С.Н. проф. д.х.н. Василенко И.А., проф. к.фарм.н. Деминой Н.Б., к.фарм.н. Шохина И.Е., к.х.н. Новожилова О.В., Мешковского А.П., Спицкого О.Р. – М., Изд-во «Перо», 2014. – С. 75–82.