

УДК 615: 519.076

В. Є. ДОРОВА, С. М. КОВАЛЕНКО, Л. М. МАЛОШТАН, К. О. СТЕПАНОВА

Національний фармацевтичний університет

ВАЛІДАЦІЯ БІОАНАЛІТИЧНИХ МЕТОДІВ ДЛЯ ФАРМАКОЛОГІЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ ЗГІДНО ВИМОГ СТАНДАРТУ ДСТУ ISO/IEC 17025: 2005

У роботі розглянуті аспекти валідації методів, що використовуються в різних біологічних та фармакологічних дослідженнях. Аналіз існуючої нормативної бази стосовно проведення валідації, показав, що на відміну від сучасних виробничих процесів та аналітичних методів для контролю якості лікарських засобів, доклінічні дослідження не мають достатнього методичного забезпечення з питань валідаційної оцінки їх придатності. Враховуючи вимоги стандарту ISO/IEC 17025: 2005 були запропоновані підходи до створення планів валідації біоаналітичних методик. На базі Проблемної лабораторії морфофункціональних досліджень за цими рекомендаціями проведено валідацію нової методики.

Ключові слова: валідація; стандарти; біоаналітичні методи дослідження; лікарські засоби; невизначеність вимірювань

ПОСТАНОВКА ПРОБЛЕМИ

На сьогодні лише незначна кількість серед десятків випробувальних лабораторій України фактично відповідає вимогам міжнародного стандарту ISO/IEC 17025: 2005, який базується на підходах до забезпечення якості, викладених в стандартах ISO 9001: 2000. Стандарт ДСТУ ISO/IEC 17025: 2006 визначає комплекс загальних вимог до компетентності лабораторій, формуючи систему взаємної довіри до результатів їхньої роботи [7].

Одним із інструментів забезпечення якості у випробувальній лабораторії при проведенні таких вимірювань є оцінка придатності (валідація) методик. Сьогодні відповідно до вимог державного стандарту ДСТУ ISO 17025 рекомендується оцінювати придатність (валідувати): створені/розроблені лабораторією методики, нестандартизовані методики, стандартні методики, що використовуються поза межами цільової сфери їхнього застосування, а також, у випадку розширення та модифікації стандартизованих методик, для підтвердження того, що вони підходять для цільового застосування в лабораторії. Крім того, «The Fitness for Purpose of Analytical Methods EURACHEM Guide» як один з документів, що на міжнародному рівні надає

рекомендації стосовно проведення валідації методик, пропонує валідувати всі методики, що застосовуються в лабораторії.

Одним з найважливіших етапів створення лікарських засобів (ЛЗ) є доклінічні випробування — цілий комплекс дослідницьких процедур та операцій з вивчення нешкідливості та специфічної активності потенційних ЛЗ. Належне проведення цих досліджень повинно гарантувати у подальшому безпечність і високу терапевтичну ефективність розроблених ЛЗ.

Головним інструментом доклінічних досліджень є різноманітні фармакологічні методи, при застосуванні яких проводиться ряд аналітичних вимірювань і тестів на тих чи інших біологічних об'єктах. Тому ці методи можна класифікувати як біоаналітичні. Важливою проблемою при проведенні валідації біоаналітичних методик є відсутність чітких методичних рекомендацій з вибору необхідних параметрів та методів проведення. Крім того, використання стандартних зразків (як базового елемента при проведенні валідації хіміко-аналітичних методик) є найчастіше неможливим при оцінці біологічних зразків через їх відсутність.

АНАЛІЗ ОСТАННІХ ДОСЛІДЖЕНЬ І ПУБЛІКАЦІЙ

Дослідження з питань валідації у фармації досить добре представлені у наукових працях

вчених, але аналіз публікацій свідчить про те, що здебільшого порушуються та розкриваються питання валідації хіміко-аналітичних методик [1, 2], біоаналітичних методів визначення метаболітів у біологічних рідинах за допомогою рідинної хроматографії та маспектроскопії [9], виробничих процесів [8, 10] та деяких імунологічних методів дослідження ЛЗ [3].

Таким чином, набувають актуальності питання, пов'язані із визначенням особливостей процесу валідації біоаналітичних методів, що використовуються при доклінічних фармакологічних дослідженнях ЛЗ та розробки методичних підходів до організації та проведення таких валідаційних робіт.

ВИДІЛЕННЯ НЕ ВИРІШЕНИХ РАНІШЕ ЧАСТИН ЗАГАЛЬНОЇ ПРОБЛЕМИ

У відповідності до сучасних вимог ISO/IEC 17025: 2005 використання валідованих методик хімічного, мікробіологічного, фармакологічного аналізу ЛЗ є досить бажаним і рекомендується наказом МОЗ України від 25.09.2008 р. № 543 «Про затвердження змін до наказу МОЗ від 26.08.2005 р. № 426 «Про затвердження Порядку державної реєстрації (перереєстрації) лікарських засобів...» як при розробці нових ЛЗ, так і при поточному контролі їхньої якості. На сьогоднішній день в Україні розвиток нормативної бази, що стосується валідації біоаналітичних методик, тільки розпочався, тоді як в США валідація біоаналітичних методів є обов'язковою умовою використання їх в лабораторіях і регламентується «Правилами» [11]. Всесвітня організація охорони здоров'я у своїх документах і проектах, складених для національного керівництва країн СНД, так само рекомендує створювати і регламентувати валідаційні процедури для біоаналітичних методів, які мають використовуватися при дослідженні ЛЗ.

ФОРМУЛЮВАННЯ ЦІЛЕЙ СТАТТІ

Метою даного дослідження є аналіз особливостей та обґрунтування методичних підходів до валідації біоаналітичних методів, які використовуються у фармакологічних дослідженнях ЛЗ, а також розробка майстер-плану проведення валідації цих біоаналітичних методик.

ВИКЛАД ОСНОВНОГО МАТЕРІАЛУ ДОСЛІДЖЕННЯ

У ДСТУ ISO/IEC 17025: 2006 надано таке визначення: «валідація (оцінка придатності) методики — підтвердження шляхом дослідження та надання об'єктивних доказів того, що конкретні вимоги до специфічного цільового використову-

вання виконуються» [7]. Тобто, методика повинна бути відповідним чином оцінена: досліджені та оцінені характеристики результатів вимірювань за даною методикою. Якщо оцінені характеристики відповідають поставленим до методики вимогам, то методика вважається валідованою в лабораторії, її можна застосовувати для випробування зразків замовників.

Валідація методики у лабораторії повинна проходити з дотриманням умов специфічності: використовується відкаліброване робоче обладнання, яке експлуатується належним чином; персонал, який бере участь у валідації, має необхідну компетенцію; приміщення відповідає вимогам до моніторингу умов оточуючого середовища та приміщень, які описані в розділі 5.3 стандарту ДСТУ ISO/IEC 17025: 2006 [7].

Набір валідаційних характеристик, які необхідно визначати, залежить від методу, типу продукції чи об'єкту випробування/вимірювання, а також біологічних тест-систем, на яких буде проводитися дослідження. Для певних методів можуть визначатися такі валідаційні характеристики: стійкість до зовнішніх впливів (робастність), селективність/специфічність методу, лінійність, правильність, відтворюваність, повторюваність (збіжність), чутливість до впливів параметрів зразка/об'єкта випробування. Набір характеристик та методологічні підходи до їх визначення залежать від кожної конкретної методики, але наявність/відсутність кожної характеристики повинна бути обґрунтована виконавцями у відповідних валідаційних документах (валідаційному сценарії та протоколі). Згідно вимог ДСТУ ISO/IEC 17025: 2006 при проведенні валідації методик необхідно визначати стандартну невизначеність та розширену стандартну невизначеність. Враховуючи достатньо великий обсяг часу, який потрібний для виконання валідаційних робіт, їхню трудомісткість і затратність, перш за все потрібно ретельно спланувати ці дії.

На базі Проблемної лабораторії морфофункціональних досліджень НФаУ був розроблений валідаційний майстер-план для оцінки придатності методик, які використовуються в доклінічних фармакологічних дослідженнях ЛЗ. Його структурна блок-схема надана на рис.1.

На завершальному етапі проводиться затвердження концепції валідації, розробляється валідаційний сценарій для оцінки конкретної методики та протокол, а також розглядається та затверджується форма майбутнього звіта.

Практична реалізація розробленого майстер-плану була здійснена на базі Проблемної лабораторії морфофункціональних досліджень Націо-



Рис.1. Блок-схема валідаційного майстер-плану для оцінки придатності біоаналітичних методик для фармакологічних досліджень ЛЗ.

нального фармацевтичного університету (ПЛМД НФаУ). У вересні 2009 року Національне агентство з акредитації України провело переакредитацію лабораторії на відповідність до вимог ДСТУ 17025-2006 у кількох галузях: токсикологічні випробування побутової хімії та парфумерно-косметичної продукції, визначення біологічних показників дії біологічно-активних добавок та

ЛЗ. Згідно з вимогами ДСТУ 17025-2006 у ПЛМД НФаУ було розпочато роботу з валідації біоаналітичних вимірювань. За вище наведеним майстер-планом було розроблено валідаційний сценарій, протокол та проведено валідацію методики «Визначення цитотоксичної/цитопротекторної дії зовнішніх дестабілізуючих чинників на культуру клітин в умовах *in vitro*» [5].

У процесі оцінки за допомогою діаграми Ішкави був проведений аналіз можливих причин втрати точності при проведенні робіт із біологічними об'єктами. Основними з яких є: «оператор-лаборант», що виконує дану методику, «час вимірювання» та «зразок» (суспензія клітин), яка готується оператором-лаборантом за певною СОП при кожному проведенні досліджу.

За методикою була накреслена статистична модель, визначені валідаційні характеристики методики: точність, правильність, лінійність. Проведена оцінка невизначеності вимірювання як важливої складової характеристики точності результатів, що забезпечується даною методикою.

При розробці нової методики «Вивчення впливу дестабілізуючих чинників на моделі кісткового мозку щурів *in vitro*» на базі запропонованого майстер-плану було проведено повну валідацію з урахуванням усіх особливостей цієї методики, що дозволило скласти бюджет невизначеності, а також визначити її робочі характеристики та контрольні межі для оцінки якості проведення вимірювань [4, 6].

ВИСНОВКИ ТА ПЕРСПЕКТИВИ ПОДАЛЬШИХ РОЗВІДОК

1. Проведений аналіз стану забезпечення якості фармакологічних доклінічних досліджень лікарських засобів показав, що на сьогоднішній день в Україні організації та методичному забезпеченню валідації біоаналітичних методів приділяється недостатня увага.
2. Розроблено валідаційний майстер-план для оцінки біоаналітичних методик, що використовуються у фармакологічних дослідженнях ЛЗ, у якому визначено необхідні дії та основні документи для проведення валідації.
3. На базі Проблемної лабораторії морфофункціональних досліджень розпочато роботу з валідації біоаналітичних методик та за допомогою запропонованого майстер-плану проведено оцінку придатності двох методик.
4. У подальшому доцільно створити алгоритми для розробки валідаційних документів та розробити методичні рекомендації щодо організації, методичних підходів до валідації та моделювання біоаналітичних вимірювань.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ІНФОРМАЦІЇ

1. Евтифеева О. А. Стандартизированная процедура валидации методик количественного определения экстенпоральных лекарственных средств в условиях аптек и лабораторий по контролю качества/В. А. Георгианц//Фармаком. — 2007. — № 1. — С. 69–81.
2. Гризодуб А. И. Стандартизированная процедура валидации методик количественного анализа лекарственных средств методом стандарта/Д. А. Леонтьев, Н. В. Денисенко, Ю. В. Подпружников//Фармаком. — 2004. — № 3. — С. 1–15.
3. Давлетбаева Л. Р. Валидация аналитических методов исследования. Валидация количественного иммуноферментного анализа/А. Г. Исфраилов, С. И. Положенцев, Р. Р. Нигматулин//Химия, химическая технология и биотехнология на рубеже тысячелетий: Международная научная конференция. — Томск: Изд-во ТПУ. — 2006. — С. 362–365.
4. Доброва В. Е. Валидация методики изучения влияния дестабилизирующих факторов на модели костного мозга крыс/Е. В. Должикова, Е. С. Колесник, К. А. Степанова//Системы обработки информации: сб. науч. праць. — 2009. — Вып. 5 (79). — С. 58–61.
5. Доброва В. Е. Разработка альтернативной методики изучения влияния дестабилизирующих факторов на биологические объекты на модели «*in vitro*»/Е. В. Должикова, Л. Н. Малоштан, Е. А. Степанова//Материалы Международной научно-практической конференции «Фармация Казахстана: интеграция науки, образования и производства». — 2009. — Том 2. — С. 310–313.
6. Доброва В. Е. Дослідження цитопротекторного впливу електромагнітного випромінювання міліметрового діапазону на клітини кісткового мозку щурів/О. В. Должикова, Л. М. Малоштан, К. О. Степанова//Збірник наукових праць співробітників НМАПО ім. П. Л. Шупика. — 2009. — Випуск 18, книга 1. — С. 341–345.
7. ДСТУ ISO/IEC 17025: 2006 Загальні вимоги до компетентності випробувальних та калібрувальних лабораторій (ISO/IEC 17025: 2005, IDT). — К.: Держспоживстандарт України. — 18 с.

8. Основные принципы проведения валидации на фармацевтическом производстве: уч. пособ. для слушателей факультета последип. образов. Провизоров/Ж.И.Алдашева, В.В.Береговых, А.П.Мешковский, Л.Л.Михайлович; под ред. В.В.Береговых. — М.: «Издательский дом «Русский врач», 2005. — 186 с.
9. Подпружников Ю.В. Разработка и валидация методики количественного определения лизиноприла в плазме крови/В.Е.Сабко, Н.Н.Кравец, В.В.Юрченко, Л.А.Попова, Л.П.Рыбьянова, И.А.Зупанец, А.С.Шаламай, С.А.Фесенко, П.Н.Бабич//Сьогодення та майбутнє фармації. — Х.: Вид-во НфаУ. — 2008. — С. 557.
10. Производство лекарственных средств. Валидация. Основные положения. Методические указания. — М.: «Ремедиум», 2001. — 16 с.
11. 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, Rockvill, Maryland, May 2001.

УДК 615: 519.076

В работе рассмотрены аспекты валидации методов, используемых в различных биологических и фармакологических исследованиях. Анализ существующей нормативной базы, касающейся проведения валидации, показал, что в отличие от современных производственных процессов и аналитических методов для контроля качества лекарственных средств, доклинические исследования не имеют достаточного методического обеспечения по вопросам валидационных оценки их пригодности. Учитывая требования стандарта ISO/IEC 17025: 2005 были предложены подходы к созданию планов валидации биоаналитических методик. На базе Проблемной лаборатории морфофункциональных исследований, в соответствии с этими рекомендациями, проведено валидацию новой методики.

Ключевые слова: валидация; стандарты; биоаналитические методы исследования; лекарственные средства; неопределенность измерений

UDC 615: 519.076

The aspects of the validation methods which used in various biological and pharmacological studies was discussed in this paper. Analysis of the existing regulatory framework concerning the conduct of validation showed that, in contrast to the modern production processes and analytical methods for drug quality control, preclinical studies do not have sufficient methodological support for validation to assess their suitability. Given the requirements of the standard ISO/IEC 17025: 2005 approaches to the creation of plans bioanalytical methods validation was proposed. In accordance with these recommendations the validation of a new technique was conducted at the Problem laboratory of the morpho-functional researches.

Key words: validation; standards; bioanalytical methods of research; medicine; the measurement uncertainty.

Адреса для листування: