

## **HƯỚNG DẪN CỦA ASEAN VỀ THẨM ĐỊNH QUY TRÌNH PHÂN TÍCH**

**Được trích dẫn theo hướng dẫn của ICH (International Conference on Harmonisation):**

**-ICH Q2A: Thẩm định phương pháp phân tích: Định nghĩa và thuật ngữ, ngày 27 tháng 10 năm 1994**

**-ICH Q2B: Thẩm định quy trình phân tích: Phương pháp luận, ngày 6 tháng 11 năm 1996.**

## MỤC LỤC

- 1- Giải thích các thuật ngữ**
- 2- Giới thiệu**
- 3- Các loại quy trình phân tích cần thẩm định**
- 4- Các chỉ tiêu trong thẩm định quy trình phân tích**
  - 4.1- Tính đặc hiệu (Specificity)**
  - 4.2- Tính tuyến tính (Linearity)**
  - 4.3- Khoảng xác định (Range)**
  - 4.4- Độ đúng (Accuracy)**
  - 4.5- Độ chính xác (Precision)**
  - 4.6- Giới hạn phát hiện (Detection Limit = DL)**
  - 4.7- Giới hạn định lượng (Quantitation Limit = QL)**
  - 4.8- Độ thô (Robustness)**
  - 4.9- Kiểm tra tính thích hợp của hệ thống (System Suitability Testing)**

## 1- GIẢI THÍCH CÁC THUẬT NGỮ

### 1.1 Quy trình phân tích (Analytical Procedure)

Quy trình phân tích chỉ ra cách tiến hành phân tích, trong đó mô tả chi tiết các bước cần thiết để thực hiện từng phép thử phân tích. Quy trình có thể bao gồm cách pha mẫu thử, mẫu chuẩn và thuốc thử, cách sử dụng thiết bị, cách thiết lập đường chuẩn, sử dụng công thức để tính kết quả.....nhưng không chỉ giới hạn ở những phần này.

### 1.2 Tính đặc hiệu (Specificity)

Tính đặc hiệu là khả năng đánh giá chắc chắn một chất phân tích khi có mặt các thành phần khác có thể có trong mẫu thử. Thông thường các thành phần này gồm các tạp chất, sản phẩm phân hủy, chất nền... Một quy trình phân tích kém đặc hiệu có thể được hỗ trợ bằng một hoặc nhiều quy trình phân tích khác. Định nghĩa này có liên quan đến các phép thử sau:

- + Định tính là để khẳng định sự có mặt của chất phân tích.
- + Thử tinh khiết là để khẳng định tất cả các quy trình phân tích cho phép xác định chính xác hàm lượng tạp chất trong chất phân tích ví dụ như phép thử tạp chất liên quan, kim loại nặng, hàm lượng của dung môi tồn dư ...
- + Định lượng (hàm lượng hoặc hoạt lực) là đưa ra kết quả chính xác về hàm lượng hoặc hoạt lực của chất phân tích trong mẫu thử.

### 1.3 Độ đúng (Accuracy)

Độ đúng của một quy trình phân tích biểu diễn sự đồng nhất giữa giá trị tìm thấy với giá trị thực hoặc giá trị đối chiếu được chấp nhận. Đôi khi khái niệm này còn gọi là độ xác thực (trueness).

### 1.4 Độ chính xác (Precision)

Độ chính xác của một quy trình phân tích diễn tả sự thống nhất (mức độ phân tán) kết quả giữa một loạt phép đo từ nhiều lần lấy mẫu trên cùng một mẫu thử đồng nhất dưới những điều kiện mô tả. Độ chính xác có thể chia thành 3 cấp: độ lặp lại, độ chính xác trung gian và độ tái lập. Độ chính xác nên được thử trên một mẫu thử thực, đồng nhất. Tuy nhiên, nếu không có mẫu đồng nhất thì có thể dùng mẫu tự tạo hoặc một dung dịch mẫu thử. Độ chính xác thường được biểu thị dưới dạng độ dao động, độ lệch chuẩn hoặc hệ số độ dao động của một loạt phép đo.

#### 1.4.1-Độ lặp lại (Repeatability)

Độ lặp lại diễn tả độ chính xác của một quy trình phân tích trong cùng điều kiện thí nghiệm trong khoảng thời gian ngắn. Độ lặp lại còn được gọi là độ chính xác trong cùng điều kiện định lượng.

#### 1.4.2- Độ chính xác trung gian (Intermediate precision)

Độ chính xác trung gian diễn tả mức dao động của kết quả trong cùng một phòng thí nghiệm được thực hiện ở các ngày khác nhau, kiểm nghiệm viên khác nhau và thiết bị khác nhau.

**1.4.3- Độ tái lập (Reproducibility)**

Độ tái lập diễn tả độ chính xác giữa các phòng thí nghiệm ( Các nghiên cứu phối hợp giữa các phòng thí nghiệm thường được áp dụng để tiêu chuẩn hoá phương pháp).

**1.5 Giới hạn phát hiện (Detection Limit )**

Giới hạn phát hiện của một quy trình phân tích là lượng nhỏ nhất của chất phân tích trong mẫu thử có thể phát hiện được nhưng không nhất thiết để có thể định lượng được.

**1.6 Giới hạn định lượng ( Quantitation Limit)**

Giới hạn định lượng của một quy trình phân tích là lượng nhỏ nhất của chất phân tích trong mẫu thử để có thể định lượng được với độ đúng và độ chính xác thích hợp. Giới hạn định lượng là một thông số của phép định lượng các chất có nồng độ thấp trong mẫu thử, đặc biệt thường được dùng để xác định tạp chất và/hoặc sản phẩm phân huỷ.

**1.7 Tính tuyến tính (Linearity)**

Tính tuyến tính của một quy trình phân tích diễn tả kết quả phân tích thu được tỷ lệ với nồng độ (trong khoảng nhất định) của chất phân tích trong mẫu thử.

**1.8 Khoảng xác định (range)**

Khoảng xác định của một quy trình phân tích là khoảng cách giữa nồng độ trên và dưới của chất phân tích trong mẫu thử (bao gồm cả các nồng độ này), trong khoảng nồng độ này, quy trình phân tích đã được chứng minh đáp ứng độ chính xác, độ đúng và tính tuyến tính.

**1.9 Độ thô (Robustness)**

Độ thô của quy trình phân tích nhằm đánh giá khả năng duy trì của quy trình phân tích không bị ảnh hưởng bởi những biến đổi nhỏ nhưng có tính chủ định trong các thông số của phương pháp và chỉ ra mức tin cậy của quy trình trong điều kiện sử dụng bình thường.

## 2- GIỚI THIỆU

Việc thẩm định quy trình phân tích là nhằm chứng minh quy trình đó có phù hợp với mục đích ứng dụng không.

Bản hướng dẫn này đưa ra các hướng dẫn và gợi ý cho việc đánh giá các quy trình phân tích dùng trong hồ sơ đăng ký thuốc ở khu vực ASEAN. Tài liệu này chủ yếu được trích dẫn từ hai bản hướng dẫn của ICH “Q2A: Thẩm định phương pháp phân tích: Định nghĩa và thuật ngữ, ngày 27 tháng 10 năm 1994” và “Q2B: Thẩm định quy trình phân tích: Phương pháp luận, ngày 6 tháng 11 năm 1996”. Hệ phương pháp áp dụng cho các chế phẩm sinh học và công nghệ sinh học có thể khác so với các chế phẩm hoá học.

Tất cả các số liệu liên quan thu được trong quá trình thẩm định và các công thức được sử dụng để tính toán các đại lượng đặc trưng của việc thẩm định cần được đưa ra và thảo luận. Các chất đối chiếu được sử dụng trong quá trình thẩm định cần phải được đánh giá rõ ràng và kèm theo tài liệu về độ tinh khiết. Mức độ tinh khiết phụ thuộc vào mục đích sử dụng.

Trong thực tế, thường có thể phác thảo công việc thực nghiệm nhằm xem xét tiến hành đánh giá một cách thích hợp đồng thời nhiều thuộc tính để đưa ra những hiểu biết về khả năng của một quy trình phân tích, ví dụ: tính đặc hiệu, tuyến tính, khoảng xác định, độ đúng và độ chính xác. Những phương pháp phân tích theo được điển không yêu cầu thẩm định nhưng tính phù hợp của chúng phải được kiểm chứng lại ở điều kiện sử dụng thực tế.

Theo yêu cầu của ASEAN : tất cả các dữ liệu liên quan đến các chỉ tiêu thẩm định cùng với các chỉ tiêu chấp nhận tương ứng phải nộp cho cơ quan quản lý dược phẩm.

## 3- CÁC LOẠI QUY TRÌNH PHÂN TÍCH CẦN THẨM ĐỊNH

Thẩm định quy trình phân tích liên quan đến 4 loại quy trình chung sau đây:

- + Định tính
- + Định lượng hàm lượng các tạp chất
- + Phép thử giới hạn tạp chất
- + Định lượng các hoạt chất trong mẫu nguyên liệu hoặc thành phẩm thuốc hoặc một hay nhiều thành phần được chọn khác trong thành phẩm thuốc.

Sau đây là mô tả ngắn gọn các loại phép thử được đề cập trong tài liệu này:

- Định tính: nhằm để khẳng định sự có mặt của các chất phân tích trong mẫu thử. Thông thường được thực hiện bằng cách so sánh các kết quả phân tích (ví dụ như : phổ đồ, đáp ứng sắc ký, phản ứng hoá học, vv....) của mẫu thử với chất chuẩn.

- Phép thử tạp chất: có thể là định lượng hoặc thử giới hạn tạp chất trong mẫu thử, nhưng đều nhằm mục đích phản ánh chính xác mức độ tinh khiết của mẫu

thử. So với phép thử giới hạn tạp chất thì phép thử định lượng tạp chất còn yêu cầu thêm một số chỉ tiêu thẩm định khác.

- Định lượng: nhằm mục đích đo lường chất phân tích có mặt trong mẫu thử. Trong tài liệu này, định lượng được hiểu là phép đo hàm lượng một hoặc nhiều thành phần chính của dược chất. Đối với thành phẩm thuốc, những chỉ tiêu thẩm định tương tự cũng được áp dụng khi định lượng các hoạt chất hoặc một hay nhiều thành phần được lựa chọn khác. Các chỉ tiêu thẩm định này cũng có thể áp dụng cho các phép định lượng liên quan đến các quy trình phân tích khác (ví dụ thử độ hoà tan).

Mục đích của quy trình phân tích phải được hiểu rõ ràng vì điều này sẽ quyết định những chỉ tiêu cần được đánh giá. Danh mục sau đây chỉ ra các chỉ tiêu điển hình trong thẩm định cần được xem xét:

Độ đúng

Độ chính xác

Độ lặp lại

Độ chính xác trung gian

Độ tái lập

Tính đặc hiệu

Giới hạn phát hiện (DL)

Giới hạn định lượng (QL)

Tính tuyến tính

Khoảng xác định

Độ thô

Các chỉ tiêu thẩm định này đã được định nghĩa trong phần giải thích các thuật ngữ. Bảng dưới đây liệt kê các chỉ tiêu được xem là quan trọng nhất cho việc thẩm định các loại quy trình phân tích khác nhau. Danh mục này được xem là điển hình đối với các quy trình phân tích đã nêu, tuy nhiên các trường hợp ngoại lệ phải được giải quyết theo từng trường hợp cụ thể. Cần chú ý rằng độ thô không được liệt kê trong bảng dưới đây nhưng cần được xem xét đến ở các giai đoạn thích hợp trong quá trình phát triển quy trình phân tích.

Ngoài ra việc thẩm định lại quy trình phân tích có thể cần thiết trong các trường hợp dưới đây:

- Thay đổi trong khâu tổng hợp dược chất
- Thay đổi thành phần của thành phẩm.
- Thay đổi quy trình phân tích.

Mức độ thẩm định lại được yêu cầu tùy thuộc vào bản chất của sự thay đổi. Một số thay đổi khác cũng có thể yêu cầu phải thẩm định lại.

Loại quy trình phân tích  Các chỉ tiêu	Định tính	Xác định tạp chất		Định lượng: - Độ hoà tan - Hàm lượng/ hoạt lực
		Định lượng	Thử giới hạn	
- Độ đúng	-	+	-	+
- Độ chính xác				
+ Độ lặp lại	-	+	-	+
+ Độ chính xác trung gian	-	+(1)	-	+(1)
- Tính đặc hiệu (2)	+	+	+	+
- Giới hạn phát hiện(LOD)	-	-(3)	+	-
- Giới hạn định lượng (LOQ)	-	+	-	-
- Tính tuyến tính	-	+	-	+
- Khoảng xác định	-	+	-	+

Dấu - nhằm chỉ các chỉ tiêu này thông thường không cần phải đánh giá.

Dấu + nhằm chỉ các chỉ tiêu này cần phải đánh giá

(1) trong trường hợp đã tiến hành kiểm tra độ tái lập thì độ chính xác trung gian không cần phải xem xét.

(2) một quy trình phân tích kém đặc hiệu có thể được bổ trợ bằng một hay nhiều quy trình phân tích hỗ trợ khác.

(3) có thể cần trong một số trường hợp .

#### 4- CÁC CHỈ TIÊU TRONG THẨM ĐỊNH QUY TRÌNH PHÂN TÍCH

##### 4.1 Tính đặc hiệu.

Việc xác định tính đặc hiệu cần thiết được tiến hành trong khi thẩm định các phép thử định tính, xác định tạp chất và định lượng. Quy trình dùng để xác định tính đặc hiệu phụ thuộc vào mục tiêu đã định của quy trình phân tích. Không phải lúc nào cũng xác định được một quy trình phân tích đặc hiệu cho một chất phân tích nhất định (phân biệt hoàn toàn). Trong trường hợp này, cần thiết phải kết hợp hai hay nhiều quy trình phân tích để đạt được mức độ đặc hiệu cần thiết.

##### 4.1.1- Định tính.

Những phép thử định tính phù hợp là phép thử có thể phân biệt được các hợp chất có cấu trúc tương tự cùng có mặt trong mẫu thử. Khả năng phân biệt của một quy trình định tính có thể được khẳng định bằng kết quả dương tính của mẫu có chứa chất phân tích (có thể bằng cách so sánh với chất đối chiếu đã biết) kết hợp với kết quả âm tính của mẫu thử không chứa chất phân tích. Thêm vào đó, phép thử định tính này có thể được áp dụng cho các chất có cấu trúc tương tự hoặc gần với với cấu trúc của chất phân tích để chứng tỏ phép thử định

tính không cho kết quả dương tính với các chất này. Việc lựa chọn xem chất nào có khả năng lẫn vào mẫu phân tích cần dựa trên những đánh giá khoa học kết hợp cân nhắc xem chúng có khả năng có mặt không.

#### **4.1.2- Định lượng và thử tạp chất.**

Đối với quy trình sắc ký, các sắc ký đồ đại diện nên được sử dụng để chứng minh tính đặc hiệu và từng thành phần riêng biệt phải được ghi lại rõ ràng. Với những kỹ thuật phân tách khác cũng cần phải có những ghi chép tương tự. Giới hạn của phân tách trong sắc ký cần phải được xem xét ở mức độ phù hợp. Đối với giới hạn của phân tách trong sắc ký, chia tách quan trọng, tính đặc hiệu có thể được chứng minh bằng độ phân giải của hai thành phần được rửa giải gần nhau nhất. Trong trường hợp sử dụng phép định lượng không đặc hiệu, thì cần dùng các quy trình phân tích hỗ trợ khác để chứng minh tính đặc hiệu của chúng, ví dụ nếu dùng phương pháp chuẩn độ thể tích để định lượng các nguyên liệu khi xuất xưởng, thì có thể kết hợp phép định lượng này với phép thử tạp chất thích hợp. Cách đánh giá đều giống nhau đối với cả phép định lượng và thử tạp chất bao gồm:

##### **4.1.2.1- Những tạp chất sẵn có.**

Đối với phép định lượng, cần phải chứng minh phương pháp đã dùng phân biệt được chất cần phân tích khi có mặt của tạp chất và/hoặc các tá dược; trong thực tế, có thể thực hiện bằng cách thêm một lượng thích hợp tạp chất và/hoặc tá dược vào mẫu ban đầu cần định lượng (nguyên liệu hoặc thành phẩm) và chứng minh rằng kết quả định lượng không bị ảnh hưởng bởi sự có mặt của tạp chất và/hoặc tá dược (bằng cách so sánh với kết quả định lượng trên mẫu không thêm tạp chất và/hoặc tá dược).

Đối với phép thử tạp chất, sự phân biệt này có thể được thiết lập bằng cách thêm vào nguyên liệu hoặc thành phẩm một lượng thích hợp các tạp chất và chứng minh rằng từng tạp chất riêng biệt này được tách riêng rẽ ra khỏi nhau và/hoặc ra khỏi các thành phần khác có trong mẫu.

##### **4.1.2.2- Những tạp chất không có sẵn.**

Nếu không có tạp chất hoặc sản phẩm phân huỷ chuẩn, tính đặc hiệu có thể được chứng minh bằng cách so sánh kết quả phân tích trên mẫu thử có chứa tạp chất hoặc các sản phẩm phân huỷ bằng quy trình phân tích đã xây dựng với kết quả phân tích trên mẫu thử có chứa tạp chất hoặc chất phân huỷ bằng quy trình chính thống khác ví dụ như phương pháp dược điển hoặc quy trình phân tích khác đã được thẩm định (quy trình độc lập). Nếu cần, thì bao gồm cả so sánh trên mẫu được lưu trữ ở các điều kiện khắc nghiệt có liên quan như: ánh sáng, nhiệt độ, độ ẩm, thủy phân bằng acid/kiềm và oxi hoá.

- Để định lượng cần so sánh hai kết quả
- Để thử tạp chất cần so sánh các hồ sơ tạp chất đã thu được.

Các phép thử độ tinh khiết của định cũng rất hữu ích để chỉ ra rằng định sắc ký của chất phân tích không chứa nhiều hơn một thành phần (ví dụ phép thử độ tinh khiết bằng detector dãy di-ốt, detector khối phổ).



#### 4.2 Tính tuyến tính.

Cần đánh giá mối tương quan tuyến tính trong khoảng xác định (xem mục 4.3) của quy trình phân tích. Tuyến tính có thể thực hiện trực tiếp trên mẫu chuẩn (bằng cách pha loãng dung dịch chuẩn gốc) và/hoặc cân riêng biệt các hỗn hợp tự tạo chứa các thành phần được chất dựa trên quy trình đã đặt ra. Cách sau có thể được dùng để nghiên cứu khoảng phân tích. Tính tuyến tính được đánh giá bằng cách quan sát đồ thị của tín hiệu ứng với nồng độ hoặc hàm lượng của chất phân tích. Nếu có tương quan tuyến tính thì kết quả thử phải được đánh giá bằng phương pháp thống kê thích hợp, ví dụ bằng cách tính đường hồi quy dựa vào phương pháp bình phương tối thiểu. Trong một số trường hợp, để có được mối tương quan tuyến tính giữa định lượng và nồng độ của mẫu thử, các số liệu phân tích thu được cần phải qua một bước biến đổi toán học trước khi phân tích hồi quy. Các số liệu từ đường hồi quy có thể giúp đưa ra ước lượng toán học về mức độ tuyến tính. Cần phải đưa ra hệ số tương quan, giao điểm với trục tung, độ dốc của đường hồi quy và tổng hiệu các bình phương. Đồ thị của các số liệu cũng cần được đưa ra. Thêm vào đó, việc phân tích độ lệch khỏi đường hồi qui của các điểm dữ liệu thực tế cũng hữu ích cho việc đánh giá độ tuyến tính.

Một số quy trình phân tích như định lượng miễn dịch không thể hiện tính tuyến tính sau bất kỳ phép biến đổi nào. Trong trường hợp này, cần có một hàm thích hợp để biểu thị mối liên quan giữa đáp ứng thu được với nồng độ (lượng) chất phân tích trong mẫu.

Để xác định tính tuyến tính cần tiến hành ít nhất 5 nồng độ. Trong những trường hợp khác, cần nêu rõ lí do.

#### 4.3 Khoảng xác định

Khoảng xác định thường được lấy từ những nghiên cứu tính tuyến tính và phụ thuộc vào việc ứng dụng dự định của quy trình. Khoảng xác định được thiết lập bởi việc khẳng định quy trình phân tích đã xây dựng có tính tuyến tính, độ đúng và độ chính xác chấp nhận được khi áp dụng để định lượng mẫu thử chứa chất phân tích với hàm lượng nằm trong khoảng hoặc ở 2 cực (cực đại và cực tiểu) của khoảng xác định của quy trình phân tích.

Sau đây là các khoảng xác định tối thiểu cần được cân nhắc:

- Để định lượng nguyên liệu hoặc thành phẩm thuốc: Thường từ 80 -120% của nồng độ thử.
- Đối với độ đồng đều hàm lượng: Trong khoảng từ 70 -130% nồng độ thử trừ trường hợp do bản chất của dạng bào chế (ví dụ ống hít định liều) thì cần khoảng xác định thích hợp rộng hơn.
- Để thử độ hoà tan:  $\pm 20\%$  khoảng quy định trong tiêu chuẩn, ví dụ nếu tiêu chuẩn yêu cầu cho chế phẩm giải phóng hoạt chất có kiểm soát là phải giải phóng hoạt chất trên một khoảng từ 20% sau 1 giờ đến 90% sau 24 giờ thì khoảng được đánh giá là từ 0% đến 110% hàm lượng ghi trên nhãn.
- Để xác định tạp chất: Từ giới hạn cho phép của một tạp chất<sup>1</sup> đến 120% của tiêu chuẩn; đối với các tạp chất đã biết có độc tính bất thường hoặc sinh ra độc tính hoặc có tác dụng dược lý không mong muốn thì giới hạn phát hiện (LOD)

và giới hạn định lượng (LOQ) của tạp chất phải tương ứng với giới hạn mà tạp chất đó cần được kiểm soát.

Ghi chú: Để thâm định quy trình thử tạp chất được tiến hành trong phát triển sản phẩm có thể cần thiết phải cân nhắc khoảng xác định xung quanh một giới hạn đã được gợi ý.

Nếu định lượng và phép thử tinh khiết được thực hiện đồng thời trên cùng một phép thử và chỉ sử dụng một chuẩn 100% thì tính tuyến tính cần phải phủ toàn bộ khoảng xác định từ giới hạn cho phép tạp chất<sup>1</sup> đến 120% của tiêu chuẩn định lượng.

<sup>1</sup> tham khảo trong chương “Reporting Impurity Content of Batches” trong hướng dẫn của ICH : Các tạp chất trong dược chất mới và các tạp chất trong thành phẩm thuốc mới.

#### **4.4 Độ đúng**

Độ đúng cần được thiết lập trong khoảng phân tích xác định của quy trình phân tích.

##### **4.4.1 Định lượng**

###### **4.4.1.1- Nguyên liệu**

Một số phương pháp xác định độ đúng:

- a- Áp dụng quy trình phân tích đối với chất phân tích đã biết rõ độ tinh khiết (ví dụ chất đối chiếu)
- b- So sánh các kết quả của quy trình phân tích được đề xuất với kết quả của quy trình phân tích chính thống có độ đúng đã được công bố và/hoặc đã được xác định (quy trình độc lập xem mục 4.1.2)
- c- Độ đúng có thể được suy ra một khi độ chính xác, tính tuyến tính và tính đặc hiệu đã được thiết lập.

###### **4.4.1.2- Thành phẩm thuốc**

Một số phương pháp xác định độ đúng:

- a- Áp dụng quy trình phân tích đối với hỗn hợp mẫu tự tạo chứa các thành phần của thành phẩm thuốc mà trong đó có một lượng đã biết trước các dược chất cần phân tích được thêm vào.
- b- Trong trường hợp không có đầy đủ các thành phần để làm mẫu tự tạo thì có thể chấp nhận cho thêm một lượng đã biết của chất cần phân tích vào chế phẩm hoặc so sánh kết quả thu được với một quy trình chính thống thứ hai có độ đúng đã được công bố và/ hoặc đã được xác định (quy trình độc lập xem mục 4.1.2)
- c- Độ đúng có thể được suy ra một khi độ chính xác, tính tuyến tính và tính đặc hiệu đã được thiết lập.

#### 4.4.2 *Tạp chất (định lượng)*

Độ đúng phải được tiến hành trên các mẫu thử (nguyên liệu hoặc thành phẩm thuốc) đã được thêm một lượng tạp chuẩn đã biết. Trong trường hợp không có tạp và/hoặc sản phẩm phân huỷ chuẩn thì có thể chấp nhận so sánh kết quả thu được với một quy trình độc lập (xem mục 4.1.2). Hệ số đáp ứng của hoạt chất cũng có thể được sử dụng.

Trong mọi trường hợp, cần phải xác định rõ từng tạp chất hoặc tổng các tạp chất được tính như thế nào so với chất phân tích chính (ví dụ khối lượng/ khối lượng hoặc phân trăm diện tích).

#### 4.4.3 *Các dữ liệu cần có*

Độ đúng phải được tính dựa trên tối thiểu 9 lần định lượng trên ít nhất 3 mức nồng độ khác nhau trong khoảng nồng độ đã được xác định của quy trình phân tích (ví dụ 3 nồng độ, mỗi nồng độ được tiến hành 3 lần).

Độ đúng được biểu thị dưới dạng phần trăm tìm thấy của chất phân tích trước đã biết được thêm vào mẫu thử hoặc độ lệch giữa giá trị trung bình đo được và giá trị thực cùng với khoảng tin cậy.

#### 4.5 **Độ chính xác**

Thẩm định các phép thử định lượng và các phép thử xác định hàm lượng tạp chất cần xác định độ chính xác.

##### 4.5.1 *Độ lặp lại. (Repeatability)*

Độ lặp lại có thể được đánh giá trên kết quả của:

- a- Tối thiểu 9 lần định lượng trong khoảng nồng độ đã được xác định của quy trình  
(ví dụ 3 nồng độ, mỗi nồng độ được tiến hành 3 lần) hoặc
- b- Tối thiểu 6 lần định lượng ở nồng độ thử 100%.

##### 4.5.2 *Độ chính xác trung gian (Intermediate Precision)*

Việc xác định độ chính xác trung gian phụ thuộc vào tình hình cụ thể đối với từng quy trình phân tích được áp dụng. Cơ sở đăng ký cần chỉ ra ảnh hưởng của các biến cố ngẫu nhiên đến độ chính xác của quy trình phân tích. Những thay đổi điển hình cần xem xét bao gồm: ngày phân tích, kiểm nghiệm viên, thiết bị, v.v....Thực tế không cần phải nghiên cứu những ảnh hưởng này một cách riêng rẽ. Khuyến khích sử dụng thiết kế thực nghiệm (ma trận).

##### 4.5.3 *Độ tái lập (Reproducibility).*

Độ tái lập được xác định bằng cách so sánh kết quả giữa các phòng thí nghiệm. Độ tái lập được tiến hành đánh giá trong trường hợp tiêu chuẩn hoá quy trình phân tích ví dụ như đối với các quy trình trong dược điển. Những số liệu này không nằm trong hồ sơ đăng ký thuốc.

#### 4.5.4 *Dữ liệu cần có.*

Độ chính xác của mỗi một quy trình cần phải đưa ra các dữ liệu sau: Độ lệch chuẩn (standart deviation), độ lệch chuẩn tương đối (Relative standart deviation hay hệ số biến thiên = coefficient of variation) và khoảng tin cậy.

#### 4.6 **Giới hạn phát hiện (Detection Limit= DL)**

Phương pháp xác định giới hạn phát hiện tùy thuộc vào quy trình phân tích là phương pháp phân tích dụng cụ hay không dụng cụ. Ngoài các phương pháp nêu ra ở dưới đây, các phương pháp khác cũng có thể được chấp nhận để xác định giới hạn phát hiện.

##### 4.6.1 *Dựa vào quan sát.*

Phương pháp này thường dùng cho phương pháp phân tích không dụng cụ, nhưng cũng có thể dùng cho các phương pháp phân tích dụng cụ.

Giới hạn phát hiện được xác định bằng phân tích mẫu thử có chất phân tích đã biết nồng độ và xác định nồng độ tối thiểu mà tại đó có thể đọc được đáp ứng của chất phân tích.

##### 4.6.2 *Dựa vào tỉ lệ đáp ứng so với nhiễu.*

Phương pháp này chỉ có thể áp dụng cho những phương pháp phân tích có nhiễu đường nền.

Việc xác định tỉ lệ đáp ứng trên nhiễu được tiến hành bằng cách so sánh đáp ứng đo được trên mẫu thử có nồng độ chất phân tích thấp đã biết với đáp ứng của mẫu trắng và từ đó tính được nồng độ tối thiểu của chất phân tích có thể phát hiện được. Tỷ lệ đáp ứng trên nhiễu nằm giữa 3:1 hoặc 2:1 thường được chấp nhận để thiết lập giới hạn phát hiện.

##### 4.6.3 *Dựa vào độ lệch chuẩn của đáp ứng và độ dốc.*

Giới hạn phát hiện (DL) có thể được tính như sau:

$$DL = \frac{3,3 \sigma}{S}$$

Trong đó:  $\sigma$  là độ lệch chuẩn của đáp ứng

$S$  là độ dốc của đường chuẩn

độ dốc  $S$  có thể được tính dựa vào đường chuẩn của chất phân tích. Có thể xác định  $S$  theo nhiều cách khác, ví dụ như:

##### 4.6.3.1-*Dựa vào độ lệch chuẩn của mẫu trắng*

Tiến hành một số lượng thích hợp các phân tích trên mẫu trắng, đo đáp ứng nền và tính độ lệch chuẩn của các đáp ứng này.

##### 4.6.3.2-*Dựa vào đường chuẩn*

Dựa vào đường chuẩn đặc trưng của mẫu thử có chứa chất phân tích có nồng độ nằm trong khoảng DL. Số dư độ lệch chuẩn của đường hồi quy hoặc độ lệch

chuẩn của giá trị giao điểm với trục tung của đường hồi quy có thể được sử dụng như là độ lệch chuẩn.

#### 4.6.4 *Các dữ liệu cần có*

Cần đưa ra giới hạn phát hiện (DL) và cách xác định giới hạn phát hiện. Nếu DL được xác định dựa vào quan sát hoặc dựa vào tỷ lệ đáp ứng trên nhiều thì cần đưa ra các sắc ký đồ có liên quan. Trong trường hợp ước tính giá trị DL bằng tính toán hoặc bằng ngoại suy thì sau đó những ước tính này cần được đánh giá bằng cách phân tích độc lập một số lượng mẫu thử thích hợp có nồng độ đã biết gần với giới hạn phát hiện hoặc bằng giới hạn phát hiện.

#### 4.7 **Giới hạn định lượng (Quantitation Limit = QL)**

Phương pháp xác định giới hạn định lượng (QL) tùy thuộc vào quy trình phân tích là phương pháp phân tích dụng cụ hay không dụng cụ. Ngoài các phương pháp nêu ra ở dưới đây, các phương pháp khác cũng có thể được chấp nhận để xác định giới hạn định lượng.

##### 4.7.1 *Dựa vào quan sát*

Phương pháp này thường dùng cho phương pháp phân tích không dụng cụ, nhưng cũng có thể dùng cho các phương pháp phân tích dụng cụ.

Giới hạn định lượng (QL) thường được xác định bằng phân tích mẫu thử có chất phân tích đã biết nồng độ và xác định nồng độ tối thiểu mà tại đó có thể định lượng được chất cần phân tích với độ đúng và độ chính xác có thể chấp nhận được.

##### 4.7.2 *Dựa vào tỉ lệ đáp ứng so với nhiều*

Phương pháp này chỉ dùng cho những phương pháp phân tích có thấy được sự nhiều đường nền.

Việc xác định tỉ lệ đáp ứng trên nhiều được tiến hành bằng cách so sánh đáp ứng đo được trên mẫu thử có nồng độ chất phân tích thấp đã biết so với đáp ứng của mẫu trắng và xác định nồng độ tối thiểu của chất phân tích có thể định lượng được. Tỷ lệ đáp ứng trên nhiều thông thường là 10:1

##### 4.7.3 *Dựa vào độ lệch chuẩn của đáp ứng và độ dốc*

Giới hạn định lượng (QL) có thể được tính như sau:

$$QL = \frac{10 s}{S}$$

Trong đó: s là độ lệch chuẩn của đáp ứng

S là độ dốc của đường chuẩn

Độ dốc S có thể được tính dựa vào đường chuẩn của chất phân tích. Cũng có thể được tính theo nhiều cách khác ví dụ như:

##### 4.7.3.1 *Dựa vào độ lệch chuẩn của mẫu trắng*

Tiến hành một số lượng thích hợp các phân tích trên mẫu trắng, đo dao động của đáp ứng nền và tính độ lệch chuẩn của các đáp ứng này.

#### 4.7.3.2- Dựa vào đường chuẩn

Xây dựng đường chuẩn đặc trưng của mẫu thử có chứa chất phân tích có nồng độ nằm gần trong khoảng QL. Số dư độ lệch chuẩn của đường hồi quy hoặc độ lệch chuẩn của các giá trị giao điểm với trục tung của đường hồi quy có thể được sử dụng như là độ lệch chuẩn.

#### 4.7.4 Các dữ liệu cần có

Cần đưa ra giới hạn định lượng (QL) và cách xác định giới hạn định lượng. Giới hạn này sau đó cần được đánh giá bằng cách phân tích một số lượng mẫu thử thích hợp có nồng độ đã biết gần với giới hạn định lượng hoặc bằng giới hạn định lượng.

#### 4.8 Độ thô (Robustness)

Việc đánh giá độ thô cần được xem xét trong giai đoạn phát triển phương pháp và tùy thuộc vào loại quy trình phân tích đang nghiên cứu. Độ thô chỉ ra được mức độ tin cậy của phương pháp khi có những thay đổi nhỏ có chủ định của các thông số của phương pháp. Nếu những phép đo nhạy cảm với những thay đổi điều kiện phân tích, thì điều kiện phân tích cần được kiểm soát thích hợp hoặc chỉ dẫn những điểm cần lưu ý trong quá trình phân tích. Kết quả đánh giá độ thô là kết quả đánh giá dãy các thông số phản ánh tính thích hợp của hệ thống (ví dụ phép thử độ phân giải) phải được thiết lập để đảm bảo duy trì được tính hiệu lực của quy trình phân tích bất kỳ khi nào sử dụng. Những ví dụ của các biến đổi thường gặp trong phân tích là:

- tính ổn định của các dung dịch phân tích
- thời gian chiết

Trong trường hợp sắc ký lỏng, các biến đổi thường gặp là:

- Ảnh hưởng của sự thay đổi pH trong pha động
- Ảnh hưởng của sự thay đổi thành phần trong pha động
- Các cột khác nhau (do nhà cung cấp và /hoặc lô khác nhau)
- Nhiệt độ
- Tốc độ dòng

Trong trường hợp sắc ký khí, các biến đổi thường gặp là:

- Các cột khác nhau (do nhà cung cấp và /hoặc lô khác nhau)
- Nhiệt độ
- Tốc độ dòng

#### 4.9 Phép thử tính thích hợp của hệ thống

Kiểm tra tính tương thích hệ thống là một phần không thể tách rời trong nhiều quy trình phân tích. Đánh giá tính thích hợp của hệ thống là những phép thử nhằm đánh giá tính thích hợp của toàn hệ thống phân tích được cấu thành bởi các yếu tố như máy móc thiết bị, hệ thống điện, cách tiến hành phân tích và mẫu thử. Các thông số của phép thử tính tương thích của hệ thống được thiết lập cho từng quy trình riêng biệt phụ thuộc vào loại quy trình được thẩm định. Các thông số này đặc biệt quan trọng trong các phương pháp sắc ký, xem các được diễn để có thêm thông tin.