

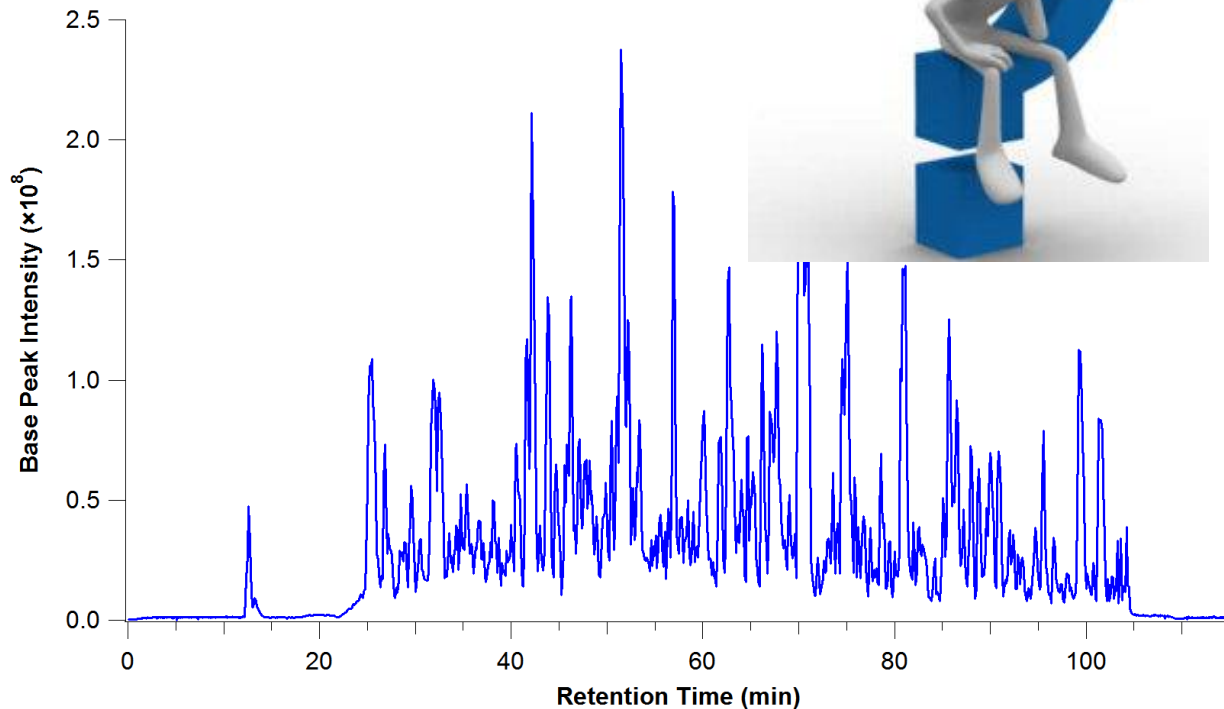
# Klinická a farmaceutická analýza

Petr Kozlík

Katedra analytické chemie

e-mail: kozlik@natur.cuni.cz

<http://web.natur.cuni.cz/~kozlik/>



# Sylabus přednášky:

- **Validace**
- **Validační parametry**
- **Validace bioanalytické metody**
- **Proces validace**
- **Příklad z validačního reportu**
- **Revalidace**
- **Transfer analytické metody**

# Validace

Ověření (důkaz), že daná metoda je vhodná k danému účelu a poskytuje výsledky s definovanou jistotou.

Validace nebo revalidace:

- Před uvedením metody do běžné praxe
- Změna podmínek pro které byla metoda validována (rozdílná matrice vzorku)
- Změna vlastní metody (objem nástřiku, změna gradientu)
- Transfer metody do jiné laboratoře

# Validace

Směrnice:

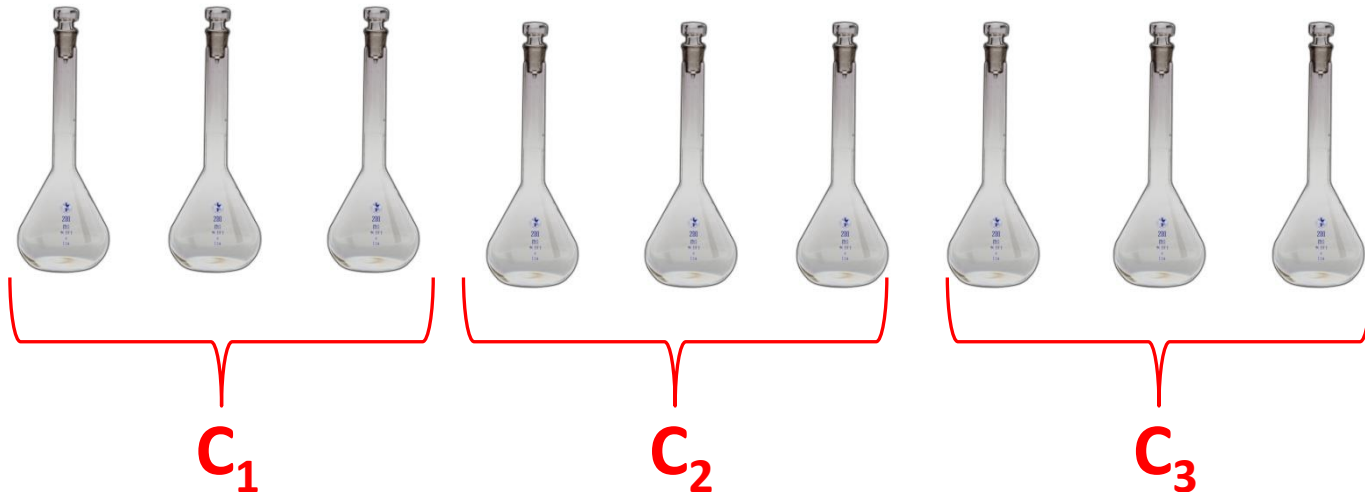
- ICH (The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use) – Evropa, USA a Japonsko
- FDA (Federal and Drug Administration)
- EMA (European Medicines Agency)
- IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry)

# Validace

**Správnost metody (accuracy):** Správnost analytické metody vyjadřuje míru shody mezi nalezenou a skutečnou hodnotou.

Správnost metody se zjistí buď analýzou modelového vzorku (obvyklý přístup), nebo použitím jiné nezávislé metody.

Výtěžnost je definována jako poměr nalezené a skutečné hodnoty, v %.



# Validace

## Přesnost metody (precision)

Přesnost analytické metody vyjadřuje míru shody nalezených výsledků pro řadu stanovení, provedených se stejným homogenním reálným vzorkem za předepsaných podmínek. Přesnost metody může být ověřena na třech úrovních: opakovatelnost, mezilehlá přesnost a reprodukovatelnost.

**Opakovatelnost** (repeatability) vyjadřuje přesnost metody za stejných podmínek v krátkém časovém intervalu. Někdy označována jako intra-assay precision.

**Mezilehlá přesnost** (intermediate precision): Mezilehlá přesnost vyjadřuje míru shody výsledků v rámci jedné laboratoře – analýza provedená jiným analytikem, na jiném zařízení, v jiný den, atd.

**Reprodukovatelnost** (reproducibility): Reprodukovatelnost vyjadřuje míru shody výsledků mezi různými laboratořemi.

# Validace

## **Opakovatelnost** (repeatability)

6 opakování na 100% koncentrační hladině hlavní látky

3 opakování pro 3 koncentrační hladiny

## **Mezilehlá přesnost** (intermediate precision)

Reflektuje rozdíly ve výsledcích způsobené například jiným analytikem, rozdílným instrumentem, rozdílné reagenty od různých dodavatelů, rozdílná šarže kolony atd.

**Reprodukovatelnost** (reproducibility): Reflektuje rozdíly ve výsledcích způsobené například v rozdílné laboratorní praxi mezi laboratořemi

# Validace

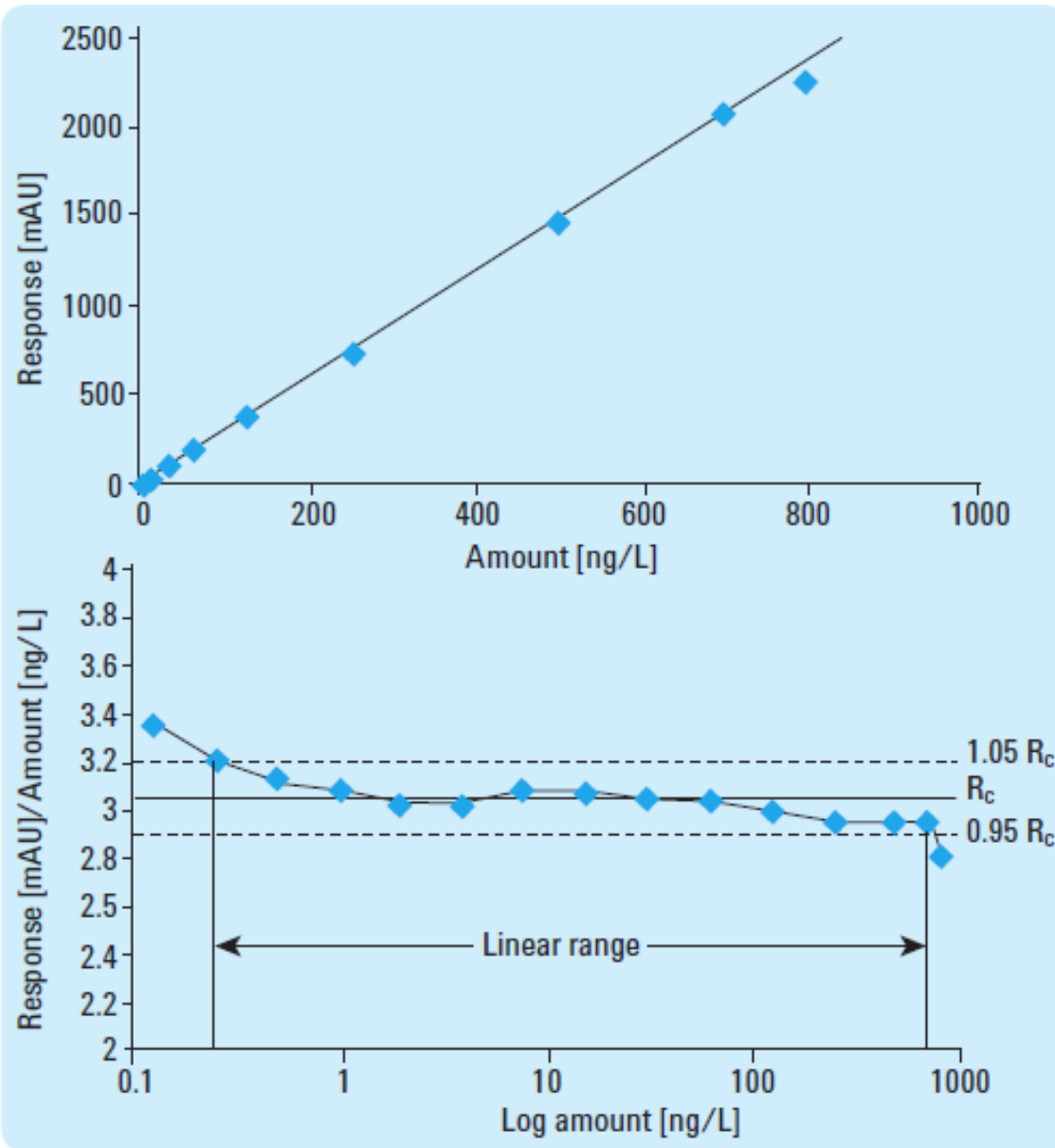
**Linearita:** Linearita analytické metody je její schopnost, v daném rozsahu, poskytovat odezvy (resp. výsledky), které jsou přímo úměrné koncentraci (množství) analytu ve vzorku.

**Provedení:**

Připraví se sada modelových vzorků sestávajících z matrice a stanovovaného analytu. Přídavek API se realizuje buď vážením, nebo ředěním zásobního roztoku. Linearita se ověří v rozsahu minimálně 5ti koncentračních hladin, pro každou koncentrační hladinu se připraví 3 nezávislé modelové vzorky.

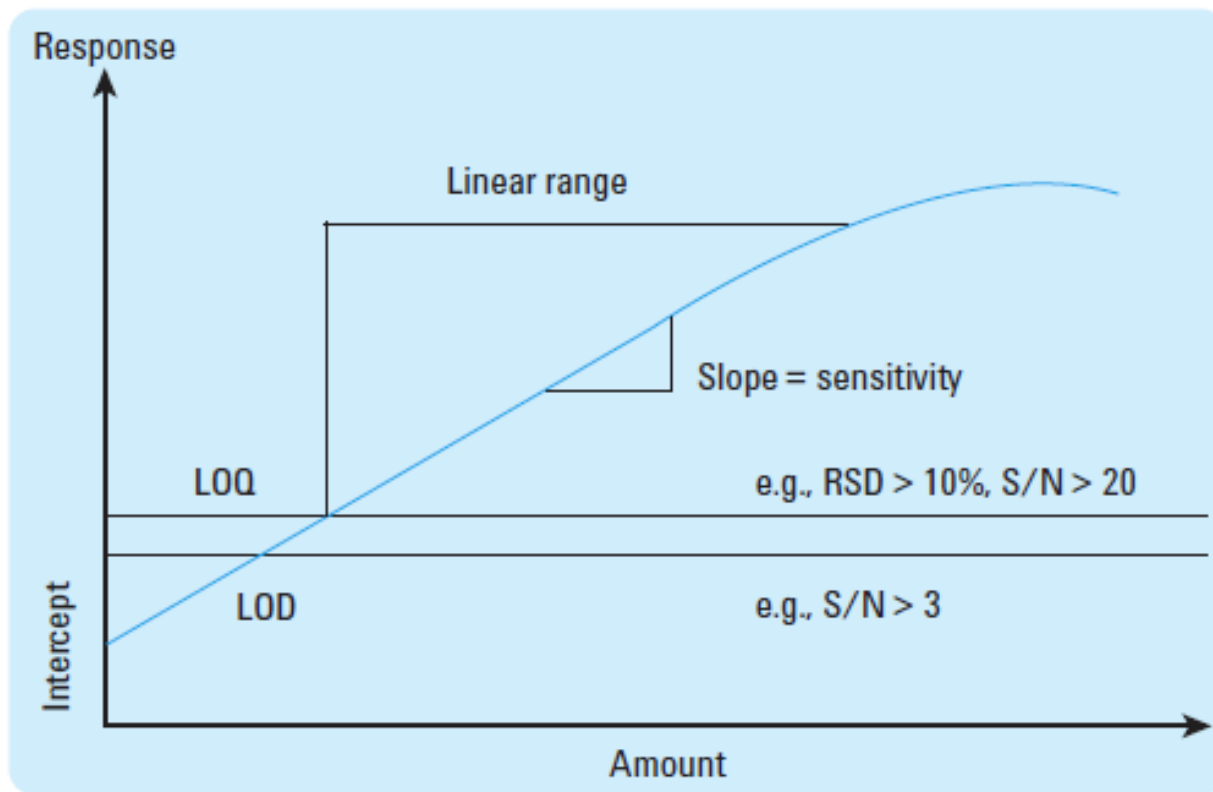


# Validace



Intercept by měl být blízky nule, pokud ne – doložit, že to neovlivňuje správnost

# Validace



**Rozmezí koncentrací** – rozmezí mezi nejnižší a nejvyšší koncentrací, pro které byla ukázána vhodná správnost, přesnost a linearita.

# Validace

## Mez detekce a mez stanovitelnosti

Detekční limit analytické metody je nejnižší detekovatelná koncentrace analytu ve vzorku. Odpovídá koncentraci, pro kterou je analytický signál statisticky významně odlišný od šumu. Kvantitativní limit analytické metody je nejnižší koncentrace analytu ve vzorku, stanovitelná s dostatečnou přesností a správností.

Veličina	Vzorec
Detekční limit	$LOD = \frac{3.3 \times \sigma}{a}$
Kvantitativní limit	$LOQ = \frac{10 \times \sigma}{a}$

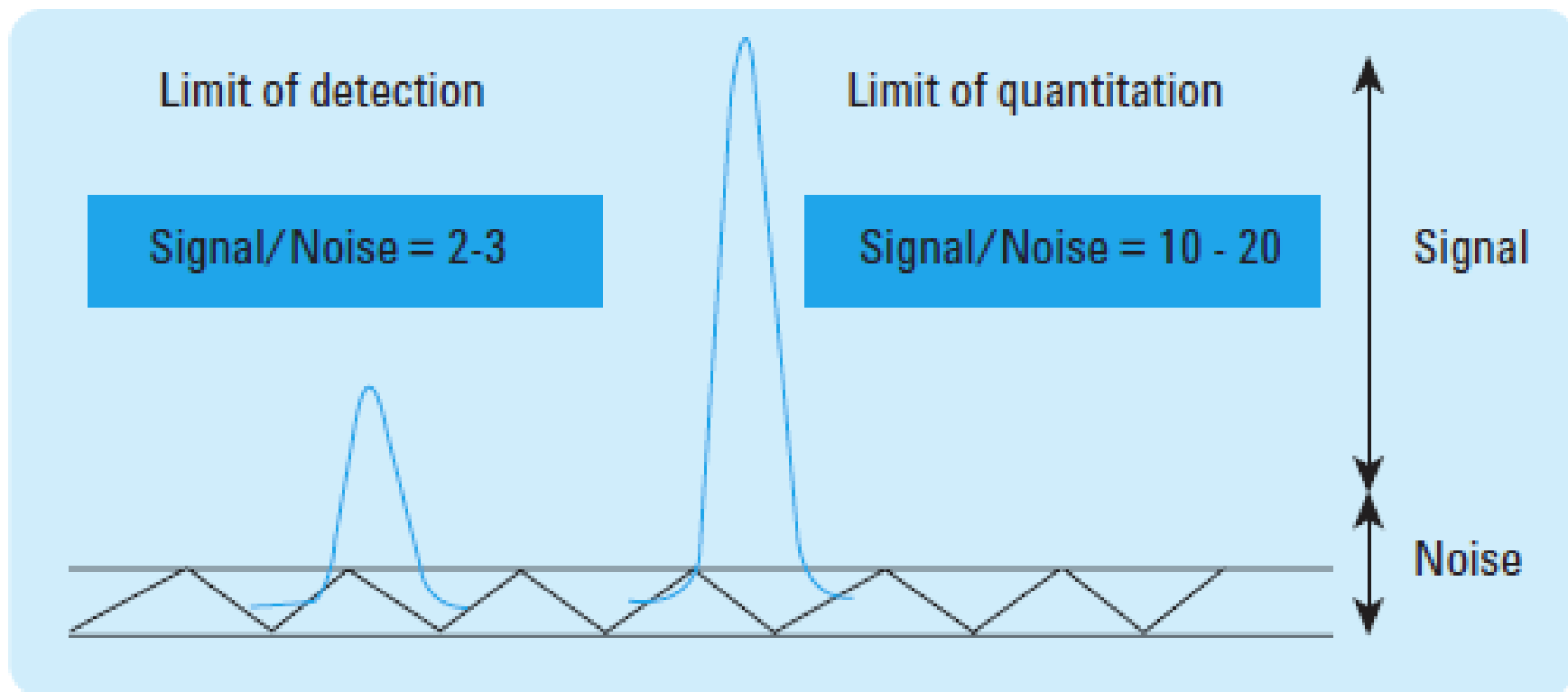
Kde:

$\sigma$  .... je průměrná hodnota šumu (rozpětí šumu) z chromatogramů roztoku placeba, respektive rozpouštědla vzorku, v příslušném časovém intervalu (pokud lze – alespoň 5ti násobek šířky píku v polovině jeho výšky a to pokud možno rovnoměrně na obě strany od místa, kde by se měl nacházet sledovaný pík)

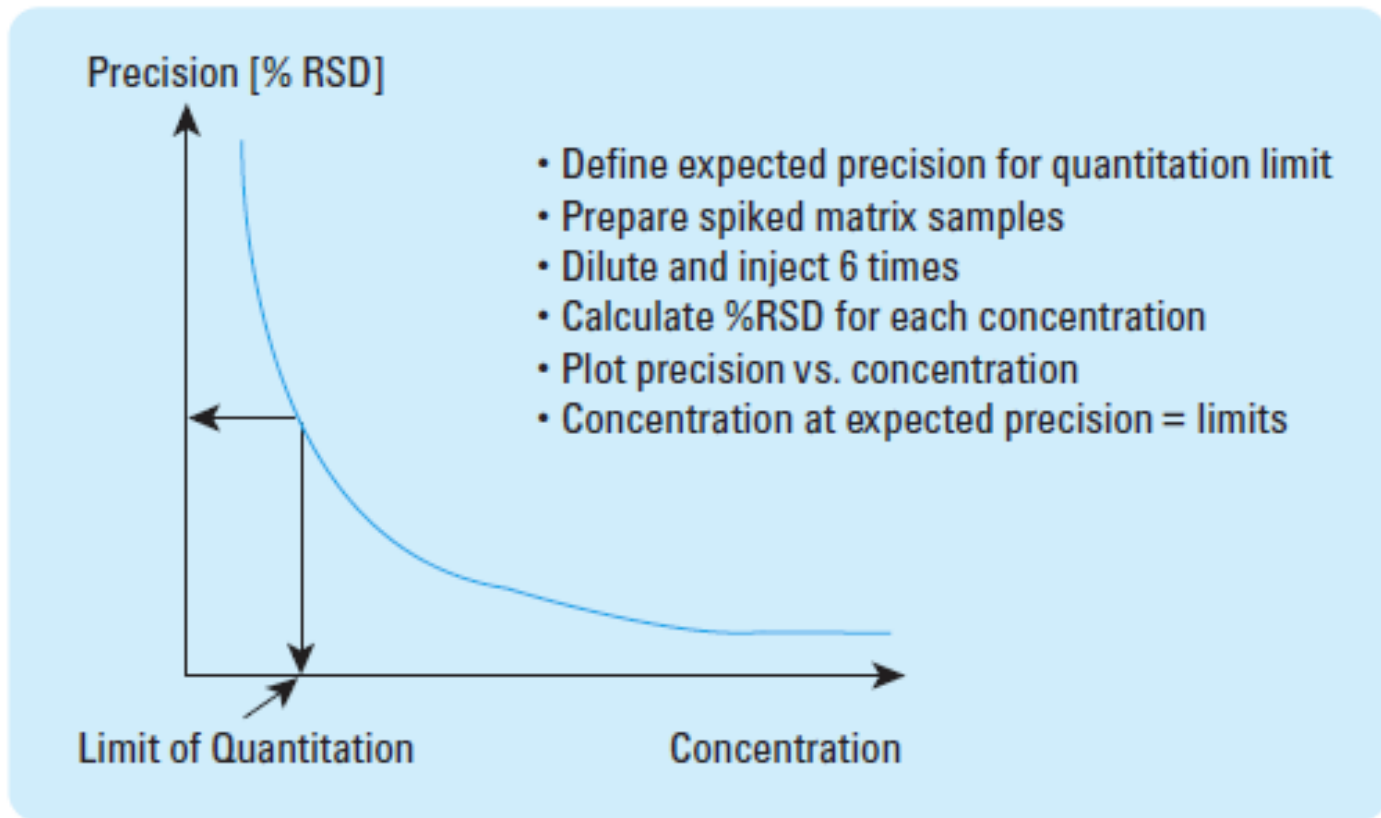
$a$  ..... je směrnice přímky (závislost výšky píku na koncentraci) získaná při měření linearity

# Validace

## Mez detekce a mez stanovitelnosti



# Validace



Hodnoty LOD a LOQ musí být ověřeny experimentálně  
Hodnoty LOD a LOQ by měly být doprovázeny hodnotami  
správnosti a přesnosti

# Validace

## Selektivita metody

Selektivita je schopnost nezkresleně stanovit analyt v přítomnosti dalších látek, jejichž přítomnost se očekává (látky neruší stanovení).

Provedení: Porovnájí se chromatogramy roztoku placebo (resp. rozpouštědla vzorku) s chromatogramy referenčního roztoku, roztoku vzorku, a pokud je to relevantní – rovněž roztoku vzorku spikovaném degradačními produkty a nečistoty ze syntézy.

V případě potřeby se provedou stresové testy (zvýšená teplota, zvýšená teplota + zvýšená vlhkost nebo přídavek vody, světlo, změny pH, oxidační činidlo) s doporučeným cílem degradace API do 10 % a zkontroluje se peak purity.

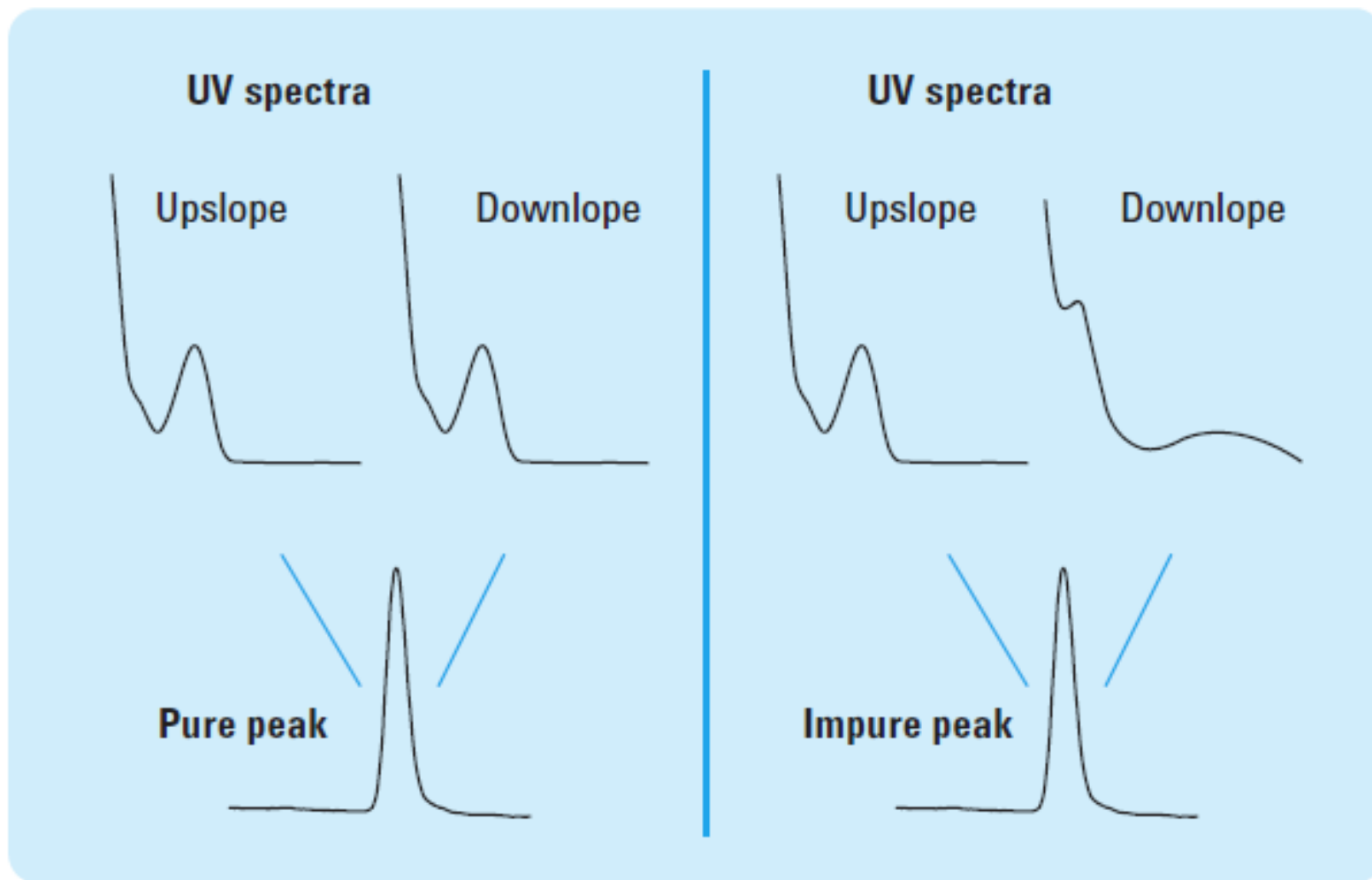
DAD detektor – změna vlnové délky

MS detektor – výběr různých skenů

Změna chromatografické metody

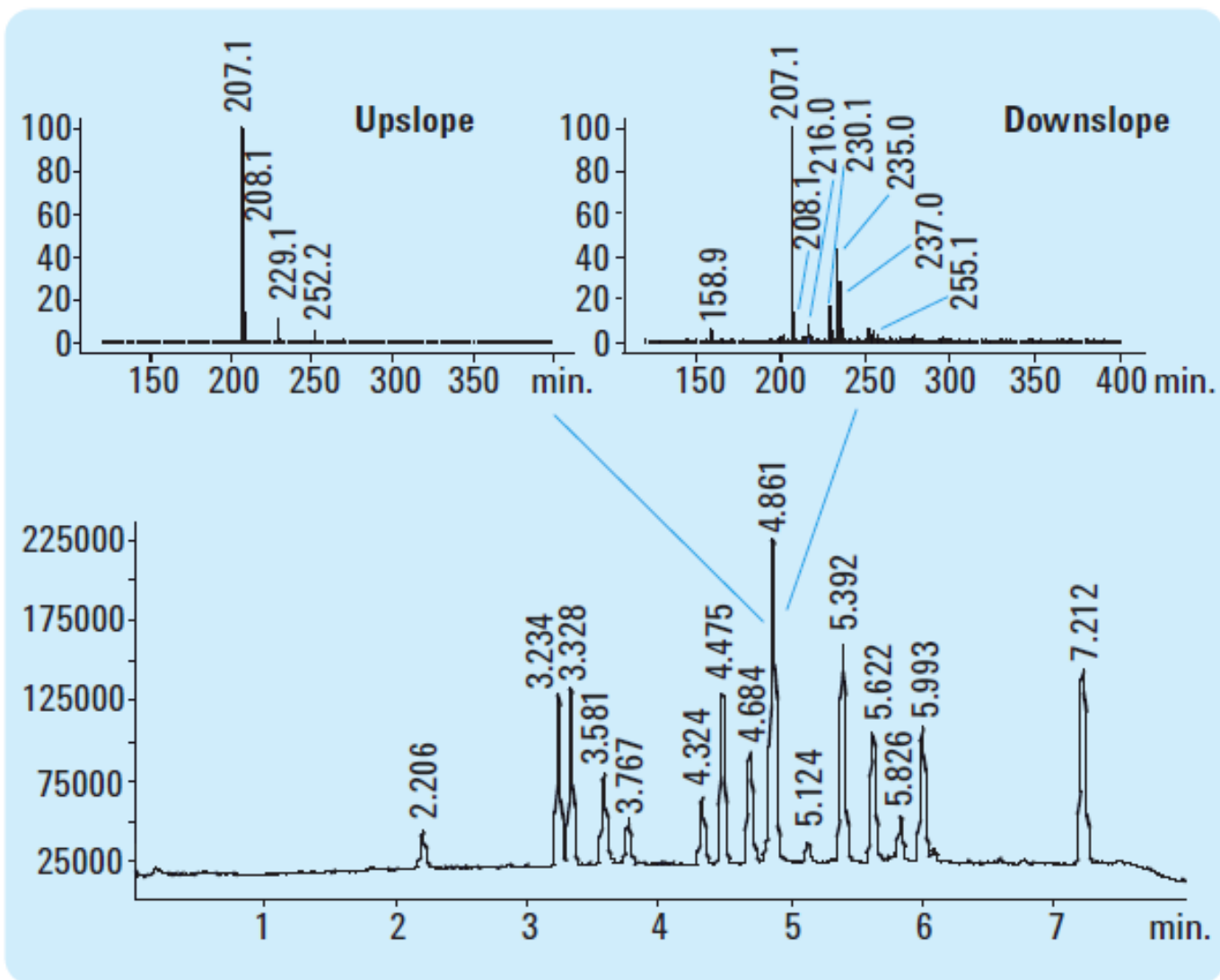
# Validace

## Selektivita metody



# Validace

## Selektivita metody





# Validace

## Robustnost metody

Robustnost analytické metody je její schopnost nebýt ovlivněna malými změnami v podmínkách analýzy.

**Provedení:** Sleduje se vliv specifických změn na analytickou metodu.

- a) Změnou jednotlivých analytických podmínek metody a posouzením dopadu na analýzu (jednorozměrná analýza dat).
- b) Analýzou vhodného počtu referenčních vzorků za předem definované sady (kombinací) podmínek, s následnou kvantifikací a vyhodnocením dat (vícerozměrná analýza dat). Pro volbu modelu a následné vyhodnocení dat se použije vhodný algoritmus (např. Placket- Burman, dílčí faktoriální design, apod.).

# Validace

## Robustnost metody

### Podmínky:

- Výběr kolony: Pro předepsaný typ kolony minimálně dvě různé kolony, které se liší šarží sorbentu.
- Složení mobilní fáze: Koncentrační změny organických komponent – obvykle 2-5 % absolutních a koncentrační změny solí, kyselin, bazí, či chirálních modifikátorů – obvykle v minimálním rozsahu  $\pm 10$  % relativních.
- pH mobilní fáze/složky mobilní fáze: Změny obvykle v rozsahu  $\pm 0,2-0,5$  jednotky pH.
- Průtok mobilní fáze: Změny obvykle v rozsahu  $\pm 10$  % relativních
- Teplota kolony: Změny obvykle v rozsahu  $\pm 5$  °C

# Validace

## Stabilita

Během nakládání s analyty může docházet k jejich degradaci (během přípravy vzorku, při skladování v lednici, v autosampleru apod.)

Běžně se testuje:

Stabilita látky v roztoku v autosampleru po 24 a 48h

Stabilita látky v roztoku “ na stole” po 24 a 48h

Stabilita látky v pevném stavu “ na stole” po 24 a 48h

# Validace

## Test způsobilosti chromatografického systému

Test způsobilosti představuje nedílnou součást metody a slouží k zajištění adekvátní účinnosti chromatografického systému. Za tímto účelem se provádí obvykle na začátku analýzy, po jakékoli změně v chromatografickém systému (např. nová mobilní fáze) a v případě jakéhokoli podezření na špatnou funkci chromatografického systému.

Test způsobilosti obvykle zahrnuje dva nebo více parametrů:

- Systémová opakovatelnost – za účelem prokázání schopnosti chromatografického systému poskytovat opakovatelnou odezvu.
- Vhodný separační parametr (například rozlišení) – za účelem prokázání adekvátní separační schopnosti chromatografického systému. Volba separačního parametru se provede na základě dat z robustnosti metody.

# Validace bioanalytických metod

- Stanovení léčiva nebo metabolitů v biologických matricích jako krev, sérum, plasma nebo moč
- Nutné v klinických a preklinických studiích v rámci bioekvivalenčních studiích, farmakologických a toxikologických experimentů
- Povaha vzorku – metody jsou komplexnější a validace je složitější oproti metodám v rámci farmacie

Diskuse vedeny od 80 let. Důležité dva dokumenty:  
FDA Guidance on Bioanalytical Method Validation

The AAPS workshop report of the conference in 2006: “Quantitative bioanalytical methods validation and implementation: Best practices for chromatographic and ligand binding assays

# Validace bioanalytických metod

Stejné validační parametry. Liší se pouze ve specifickém provedení.

**Selektivita** – analýza vhodné matrice slepého vzorku z minimálně 6 zdrojů.

- standardní přídavek známé koncentrace analytu na hladině LOQ – ukázat, že jsme schopni dostat správné výsledky.

**Přesnost** – minimálně 5 stanovení na jedné koncentraci; minimálně na třech koncentračních hladinách, které pokrývají celý rozsah. Kritéria – do 15 % a na LOQ do 20 %.

**Správnost** – vyhodnocení v rámci měření přesnosti; stejné podmínky a kritéria.

**Výtěžnost** - biologické vzorky, nutná předúprava vzorku (SPE, LLE atd.), na třech koncentračních hladinách.

**Kalibrace** – kalibrace v biologické matrici; 6-8 kalibračních bodů rozložených během celého konc. rozmezí. Nutnost používání interních standardů. Dolní hranice kalibrace je od LLOQ (lower limit of quantification). LLOQ – minimálně 5x násobek základní linie blanku s přesností a správností do 20%.

# Validace bioanalytických metod

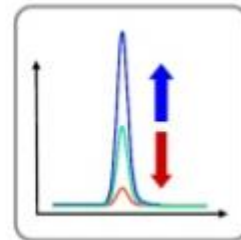
**QC vzorky** – vzorky kontrolující naši metodu. Na třech koncentračních hladinách – low QC – trojnásobek LLOQ; middle QC a high QC. Na základě QC vzorků rozhodujeme, zda výsledky našich analýz považujeme za správné či nikoliv.

- 67% QC (4 ze 6) musí mít správnost do 15%.
- Minimální počet QC vzorků je minimálně 5% z neznámých vzorků, nebo 6 QC vzorků (větší číslo)

**Matriční efekty** – při použití MS detekce nutnost. Ideálně používat isotopicky značené standardy.

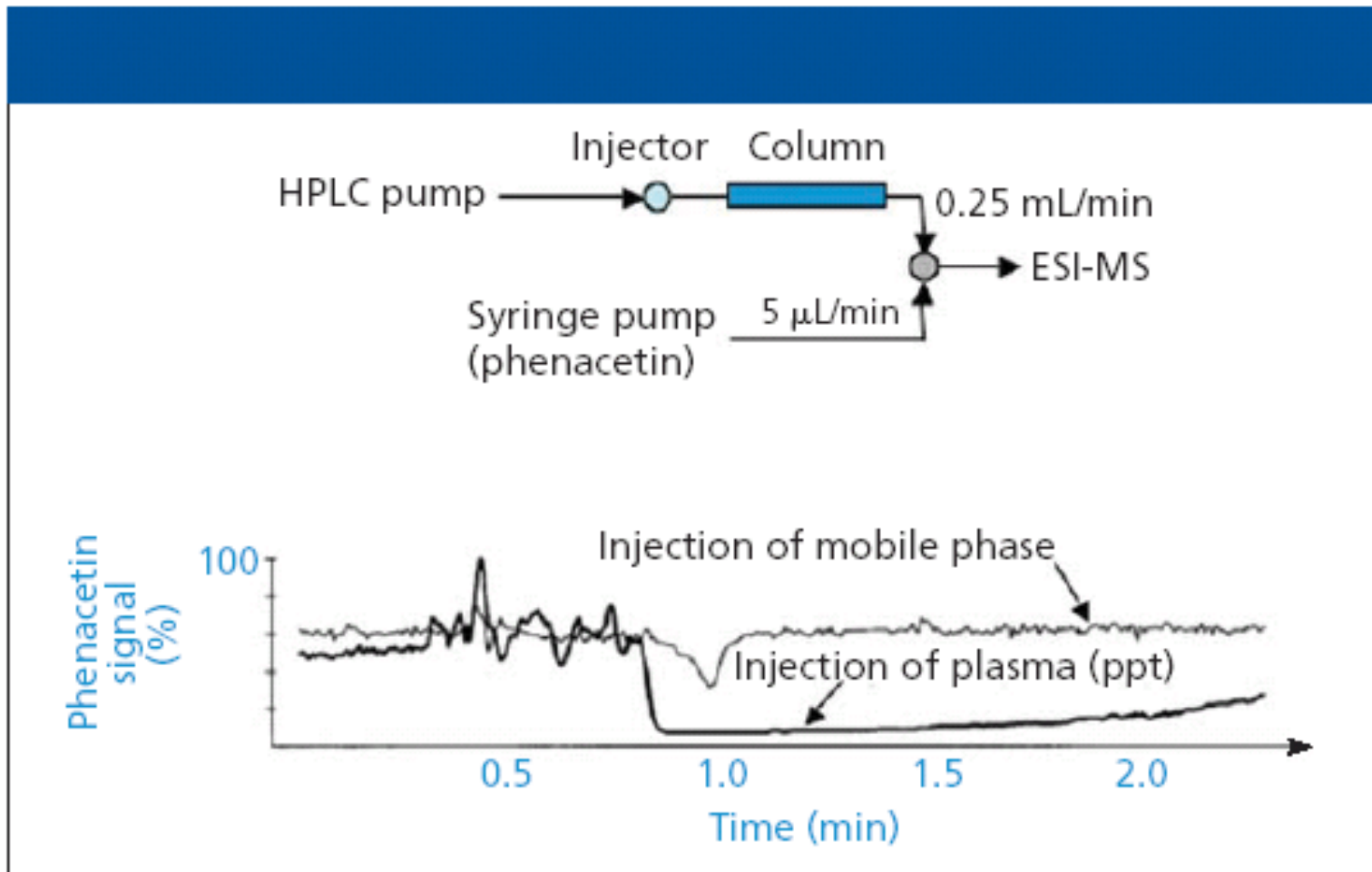
- Porovnáte směrnici kalibrace připravené z biologické matrice a z čistých rozpouštědel
- Do LC nastříknete blank biologické matrice a za kolonou externí stříkačkou pumpujete analyt a sledujete změnu intenzity.

- Signal Enhancement
- Signal Suppression



# Validace bioanalytických metod

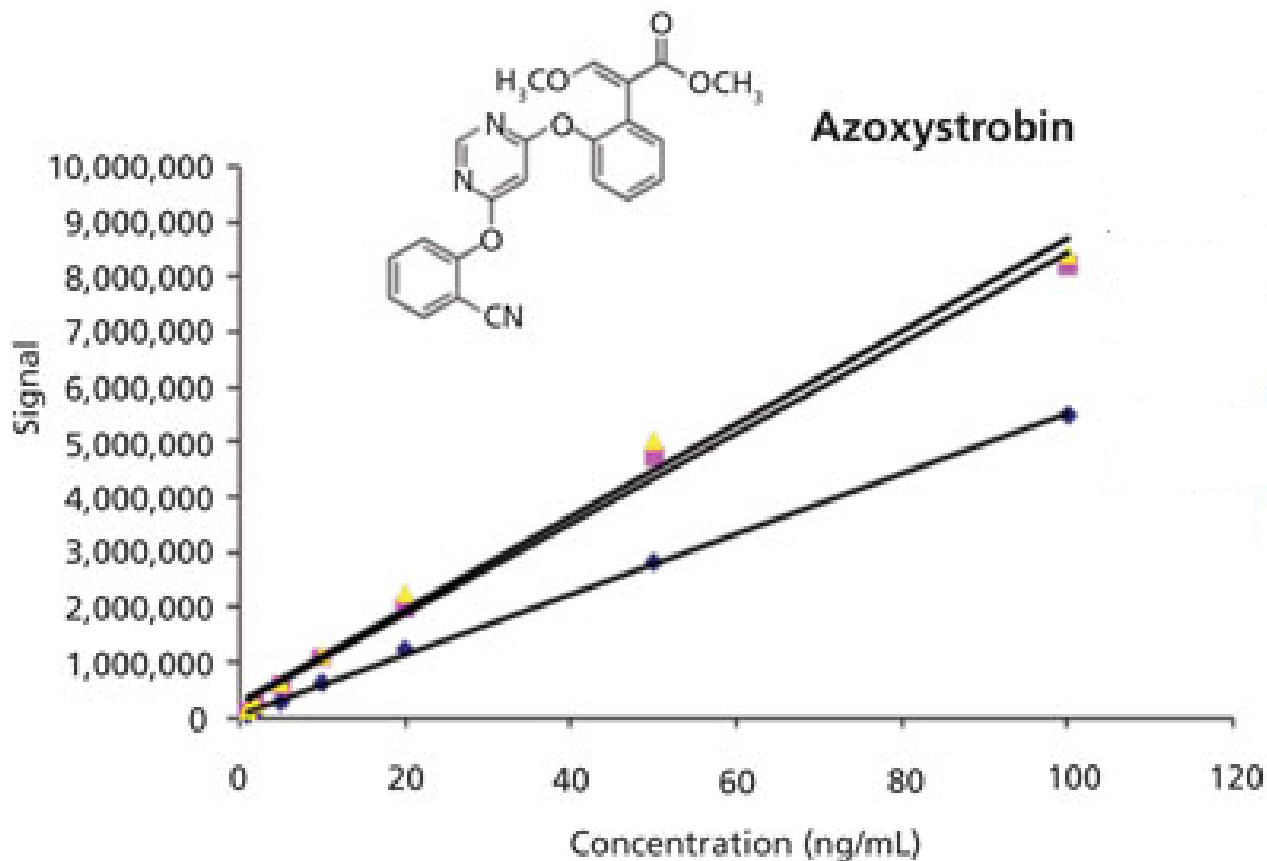
## Matriční efekty





# Validace bioanalytických metod

## Matriční efekty



# Proces validace

Předpoklad – máme vyvinutou a optimalizovanou metodu  
- máme zkvalifikovaný měřicí systém

## Několik fází:

- Cíle metody
- Definice parametrů metody
- Navrhne provedení testů
- Stanovíme akceptační kritéria
- Vytvoříme testovací protokol se všemi experimentálními detaily
- Provedeme všechny testy
- Porovnáme získané výsledky s akceptačními kritérii
- Nastavíme vhodný SST test
- Všechny experimentální podmínky a validační výsledky zpracujeme do validačního reportu

# Proces validace

## Cíle metody:

- Jaké vzorky budou analyzovány?
- Jaké analyty budou sledovány?
- Jaká je očekávaná koncentrace?
- Jaké jsou matrice vzorku?
- Jako jsou potenciální interferující látky? Měly by být detekovány a kvantifikovány?
- Jsou zde nějaké legislativní nebo regulační požadavky?
- Je nutná kvalitativní nebo kvantitativní analýza?
- Jaké jsou vyžadovány detekční a kvantifikační limity?
- Jaká je očekávána správnost a přesnost metody?
- Jak robustní by měla metoda být?
- Bude metoda používána v jedné laboratoři nebo bude zamýšlena její použitelnost v širším měřítku?

# Proces validace

## Výběr validačních parametrů:

V souladu se zamýšleným účelem.

Ne vždy je nutné validovat všechny parametry (kvalitativní vs. kvantitativní analýza)

## Příprava a provedení validace:

Chemikálie a standardy – v dostatečném množství, stabilní, odpovídat specifikaci

Analytické instrumenty – zkvalifikovány a zkalibrovány

Operátor – zkušený s instrumentací a technikou

Není dáno doporučení v jakém pořadí mají být testy prováděny, pro LC se doporučuje: 1. Selektivita, 2. Linearita, LOD, LOQ, 3. Správnost a přesnost na různých koncentračních hladinách, 4. Mezilehlá správnost a přesnost, 5. Reprodukovatelnost

# Proces validace

## Plán kontroly kvality:

- Sledování naší metody, ujištění, že funguje, tak jak má
- Nesledujeme všechny parametry, které se validovali
- Používá se system suitability tests (SST) – kontrolní vzorky, sleduje se nějaká kritická veličina

## Validační report a dokumentace:

- Cíl metody
- Přehled použité metodiky
- Látky a matrice
- Všechny chemikálie, standardy, QC vzorky – jejich čistota, zdroj, detailní popis přípravy
- Bezpečnostní doporučení

# Proces validace

## Validační report a dokumentace:

- Kritické parametry metody vzaté z testování robustnosti
- Detailní parametry a podmínky, jak byly všechny experimenty provedeny
- Jak byly výsledky statisticky vyhodnoceny + vzorce
- Popis SST
- Ukázky všech chromatogramů, spekter, kalibračních křivek + všechny původní data
- Akceptační kritéria + nejistoty měření
- Kritéria pro revalidaci
- Souhrn a závěr
- Jména, tituly, datum, podpisy všech odpovědných osob

# Validace metody v LC

Příklady z validačního reportu:

## SYSTEM SUITABILITY TEST

### a) System repeatability

5 successive injections of reference solution

Injection no.	Peak area of [redacted] [ $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ ]	Peak area of [redacted] [ $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ ]
1	403832	1160881
2	405286	1162560
3	404367	1161946
4	404463	1162376
5	404405	1162015
Average	404471	1161955
RSD [%]	0.13	0.06

### b) Symmetry factor

Symmetry factor (according to Ph.Eur.) of [redacted] peak was 1.1 and of [redacted] peak was 1.3 in the chromatogram of reference solution on current conditions.

#### Acceptance criteria:

System repeatability:  $\leq 1.5\%$

Symmetry factor: 0.8 – 1.6

**Result:** Complies.

# Validace metody v LC

## Příklady z validačního reportu:

### a) PRECISION

**Repeatability (1<sup>st</sup> analyst, 1<sup>st</sup> instrument) & Intermediate precision (2<sup>nd</sup> analyst, 2<sup>nd</sup> instrument)**

Analyses of 6 sample solutions (6 sample solutions by the first analyst and 6 sample solutions by the second analyst) obtained from multiple sampling of the same homogeneous authentic sample.

Sample no.	1 <sup>st</sup> analyst: [REDACTED]			2 <sup>nd</sup> analyst: [REDACTED]		
	Weight [mg]	Response [ $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ ]	Assay [mg/tbl. flm.]	Weight [mg]	Response [ $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ ]	Assay [mg/tbl. flm.]
1	280.02	400362	100.2	280.23	395082	98.4
2	280.34	399193	99.8	280.67	395341	98.3
3	280.50	399515	99.9	280.41	395934	98.6
4	280.40	400305	100.0	280.77	397350	98.8
5	280.13	401931	100.4	280.29	400758	99.8
6	280.08	400504	100.2	280.61	398850	99.2
Average	–	–	100.1	–	–	98.9
RSD [%]	–	–	0.22	–	–	0.57
95% confidence interval	–	–	<99.8; 100.3>	–	–	<98.3; 99.4>
Reference 1	15.958	404471	–	16.261	410103	–
Reference 2	15.966	404939	–	16.800	425666	–
<b>Difference between averages of two analysts <math>\Delta = 1.2</math> %</b>						

**Acceptance criteria:**

RSD:  $\leq 2.0$  %

$\Delta$ :  $\leq 3.0$  %

**Result: Complies**



# Validace metody v LC

## Příklady z validačního reportu:

### b) LINEARITY

Analysis of 15 solutions of model samples consisting of placebo (100 % of the test concentration) with different additions of reference standard(s) (20 %, 50 %, 70 %, 100 % and 130 % of the test concentration, 3 model samples per level).

Sample no.	Level [% of the test concentration]	Concentration	Response [ $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ ]	Residuals [ $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ ]	Response ratio [ $\mu\text{V}\cdot\text{s}/\%$ of the test conc.]
1	20	20.0	79976	-0.3	3998
2		20.0	79911	-65.3	3995
3		20.0	80205	228.7	4009
4	50	50.0	202405	-671.1	4047
5		50.0	202796	-280.1	4055
6		50.0	202629	-447.1	4052
7	70	70.0	285201	58.4	4073
8		70.0	285680	537.4	4080
9		70.0	285513	370.4	4078
10	100	100.0	408569	326.7	4085
11		100.0	409543	1300.7	4094
12		100.0	407813	-429.3	4077
13	130	130.0	530825	-517.1	4082
14		130.0	530836	-506.1	4082
15		130.0	531436	93.9	4087
Average					4060
RSD [%]					0.8
Regression line					$y = 4102x - 2090$
Residual sum of squares [ $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ ]					3729766
Correlation coefficient r					1.000
Intercept $b_{tc}$ [% of signal at the test concentration]					0.51

#### Acceptance criteria:

Correlation coefficient  $r: \geq 0.999$

Intercept  $b_{tc}: \leq 2\%$

**Result:** Complies

# Validace metody v LC

## Příklady z validačního reportu:

### c) ACCURACY

Analysis of 15 solutions of model samples consisting of placebo (100 % of the test concentration) with different additions of reference standard(s) (20 %, 50 %, 70 %, 100 % and 130 % of the test concentration, 3 model samples per level).

Sample no.	Level [% of the test concentration]	Concentration	RS added [ $\mu\text{g/ml}$ ]	Response [ $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ ]	Determination [ $\mu\text{g/ml}$ ]	Recovery [%]
1	20	20.0	16.00	79976	15.74	98.4
2		20.0	16.00	79911	15.72	98.2
3		20.0	16.00	80205	15.78	98.6
4	50	50.0	40.01	202405	39.83	99.6
5		50.0	40.01	202796	39.90	99.7
6		50.0	40.01	202629	39.87	99.7
7	70	70.0	56.01	285201	56.12	100.2
8		70.0	56.01	285680	56.21	100.4
9		70.0	56.01	285513	56.18	100.3
10	100	100.0	80.02	408569	80.39	100.5
11		100.0	80.02	409543	80.58	100.7
12		100.0	80.02	407813	80.24	100.3
13	130	130.0	104.02	530825	104.45	100.4
14		130.0	104.02	530836	104.45	100.4
15		130.0	104.02	531436	104.57	100.5
<b>Average</b>						<b>99.9</b>
<b>RSD [%]</b>						<b>0.8</b>
<b>95% confidence interval</b>						<b>&lt;98.8; 100.9&gt;</b>
<b>Reference</b>		<b>Weight [mg]</b>		<b>Response [<math>\mu\text{V}\cdot\text{s}</math>]</b>		
1		15.970		405895		
2		15.994		406333		

#### Acceptance criterion:

Recovery: 98.0 – 102.0 %

**Result:** Complies

**result:** Complies

# Validace metody v LC

## Příklady z validačního reportu:

### e) ROBUSTNESS

#### ROBUSTNESS – CHROMATOGRAPHIC SEPARATION

The following changes in chromatographic conditions were verified:

Different columns	Column 1	Column 2
Retention times [min]:		
- <del>XXXXXXXXXX</del>	2.22	2.21
- <del>XXXXXXXXXX</del>	2.56	2.54
- <del>XXXXXXXXXX</del>	2.65	2.63
- <del>XXXXXXXXXX</del>	2.79	2.77
- <del>XXXXXXXXXX</del>	2.91	2.90
- <del>XXXXXXXXXX</del>	3.44	3.45
Symmetry factor of <del>XXXXXXXXXX</del> peak	1.25	1.29
Symmetry factor of <del>XXXXXXXXXX</del> peak	0.97	0.95

Column 1 = ACQUITY CSH Phenyl - Hexyl 1.7  $\mu$ m, 2.1 x 100 mm, S.N. 01053213315629

Column 2 = ACQUITY CSH Phenyl - Hexyl 1.7  $\mu$ m, 2.1 x 100 mm, S.N. 01043209715828

pH of a component A of mobile phase	2.3	2.5	2.7
Retention times [min]:			
- <del>XXXXXXXXXX</del>	2.02	2.22	2.40
- <del>XXXXXXXXXX</del>	2.51	2.56	2.61
- <del>XXXXXXXXXX</del>	2.61	2.65	2.70
- <del>XXXXXXXXXX</del>	2.75	2.79	2.83
- <del>XXXXXXXXXX</del>	2.87	2.91	2.95
- <del>XXXXXXXXXX</del>	3.43	3.44	3.45
Symmetry factor of <del>XXXXXXXXXX</del> peak	1.25	1.25	1.28
Symmetry factor of <del>XXXXXXXXXX</del> peak	1.60	0.97	0.82

# Změna metody a revalidace

Kdy? – metoda nevyhovuje specifikaci, změna matrice, změna analytů

Metoda náhle nevyhovuje specifikaci:

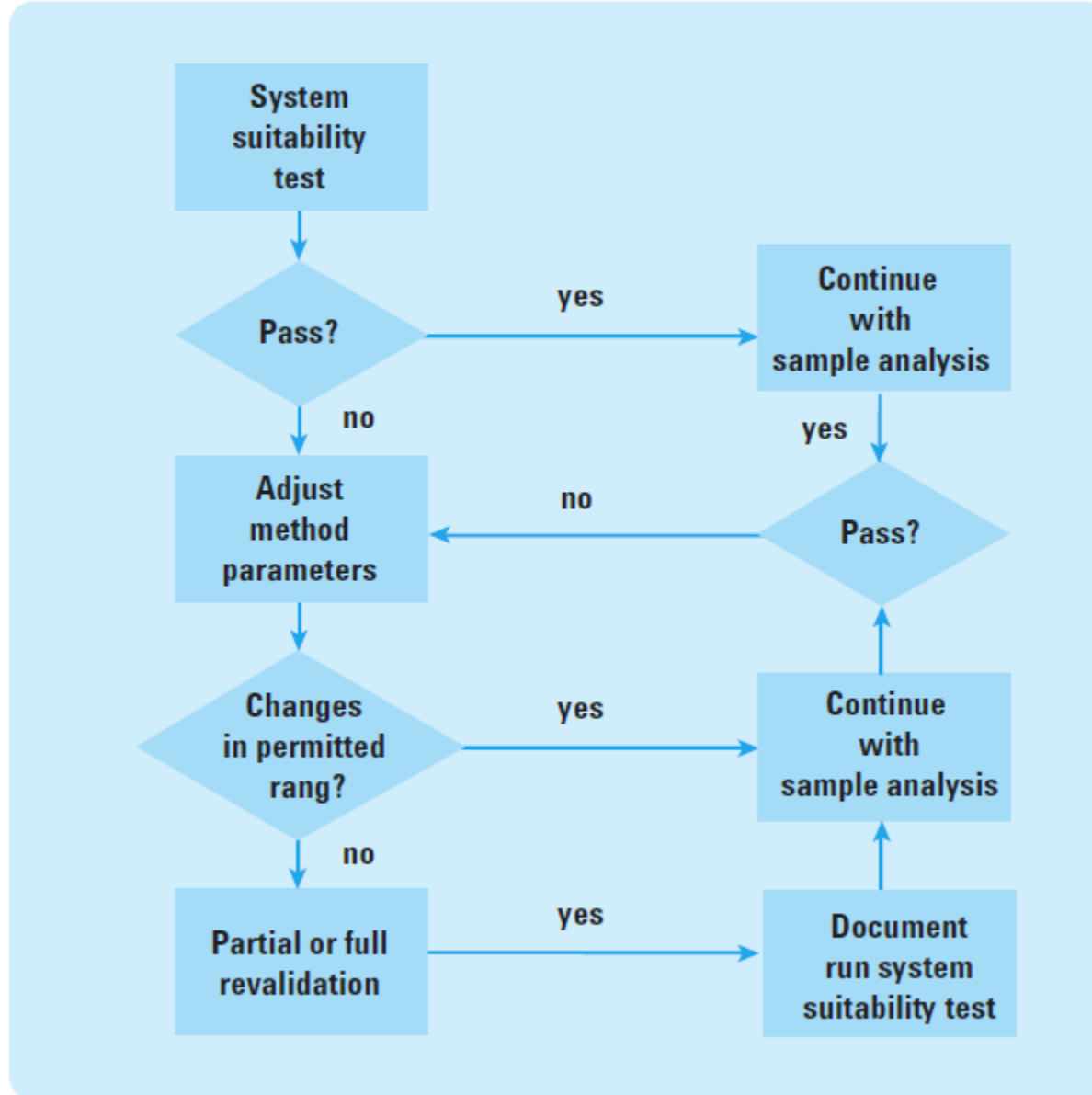
- Transfer metody z vývoje do rutinně používané laboratoře
- Instrumenty od jiných výrobců (mrtvý objem)
- Změna účinnosti kolony v čase
- Jiná šarže kolony

**Nutná revalidace??**

# Změna metody a revalidace

High Performance Liquid Chromatography		
	USP	EP
<b>Column length</b>	±70%	±70%
<b>Internal diameter</b>	Can be adjusted if linear velocity is kept constant	±25%
<b>Particle size</b>	Reduction of 50%, no increase	Reduction of 50%, no increase
<b>Flow rate</b>	±50% or more as long as linear velocity is kept constant	±50%
<b>Column temperature</b>	±10 C	±10% Max 60 C
<b>Injection volume</b>	May be decreased (if LOD and repeatability ok.)	May be decreased (if LOD and repeatability ok.)
<b>pH</b>	±0.2 units	±0.2 (±1% for neutral substances)
<b>UV wavelength</b>	No adjustment permitted	No adjustment permitted
<b>Conc. of salts in buffer</b>	±10%	±10%
<b>Composition of mobile phase</b>	Minor components (<50%) ±30% relative or ±10% absolute whichever is smaller	Minor components ±30% relative or ±2% absolute whichever is larger

# Změna metody a revalidace



# Změna metody a revalidace

## Revalidace:

- Mimo akceptační kritéria a mimo USP a EP kritéria
- Analýza nových látek mimo původně zamýšlený účel
- Změna matrice vzorku

# Transfer analytické metody

Při přechodu z vývoje do QC laboratoří, v rámci různých firem apod.

## Porovnávací testy:

- Analýza reprezentativních vzorků v obou laboratořích
- Zaměření na kritické parametry metody
- Detailní předávací protokol, dokumentace pro implementaci metody, dobrá komunikace mezi laboratořemi
- Zvolení si akceptačních kritérií pro transfer metody