

Validering af en analysemetode

Der henvises til: ICH Guideline Q2(R1, Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology).

Indledning

Alle større laboratorier, i f.ex. industrien har fuldstændig fastlagte procedurer for hvorledes analysemetoder skal valideres. Valideringsprogrammerne er opbygget omkring de samme parametre, men kan ofte være meget omfattende, hvis analysemetoderne skal kunne anvendes over en længere periode af forskellige personer og eventuelt i mange forskellige laboratorier. En sådan validering indeholder således ofte bl.a. intermediate precision (forskellige laboranter, apparaturer og reagenser) samt reproducerbarhed (studier udført på forskellige laboratorier).

I det følgende tages derfor udgangspunkt i en analysemetode, der er udviklet til et bestemt tidsbegrænset formål, f.ex. anvendelse under et speciale eller som del af et forskningsprojekt. Valideringen skal i dette tilfælde godtgøre, at alle analyser analyseret efter denne metode lever op til de fastsatte kvalitetskrav mht. præcision og nøjagtighed. En sådan validering bør omfatte bestemmelse af:

- linearitetsområde
- præcision
- detektions- og kvantiseringsgrænser
- nøjagtighed
- selektivitet

Bestemmelse af linearitetsområde (minimum 5 koncentrationer).

Kalibreringskurven skal omfatte kvantiseringsgrænsen samt den maximale forventede koncentration:

Standardopløsning	1	2	3	4	5
Kaldes	C_1	C_2	C_3	C_4	C_5
Koncentration	$2*LOQ$	$(C_1+C_3)/2$	$(C_1+C_5)/2$	$(C_3+C_5)/2$	Max. Koncentration*1,25
Replikater	6	2	6	2	6

Baggrunden for denne målestrategi kan findes i kapitlet kalibreringskurver andetsteds i dette hæfte.

Der optegnes et plot med samtlige punkter og følgende beregnes:

- Hældning og skæring
- Korrelationskoefficient, r , med fortegn
- Standardafvigelse for hældning, skæring og regressionen
- Standardafvigelser på beregnede x -værdier
- Konfidensinterval for beregnede x -værdier

Alle målinger på prøvemateriale (ukendte) foretages in duplo med fuld prøvetilberedning.

DER ER FREMSTILLET ET REGNEARK TIL BEREGNINGER

af kalibreringskurve samt indhold i prøverne

For biologiske prøver eller andre prøver med en kompliceret matrix undersøges om der er matrixinterferens. Prøven spikes på 5 koncentrationniveauer, standardadditionskurven optegnes og de ovennævnte beregninger gentages. Dette bør udføres på 6 forskellige prøver af matricen.

Kalibreringskurven bør altid være fremstillet i den aktuelle matrice.

Spektroskopiske metoder:

Hvis hældningen på standardadditionskurven er signifikant forskellig fra hældningen på kalibreringskurven (t-test), bør prøverne kvantiseres ved standardaddition.

Hvis der ikke er forskel på hældningerne kvantiseres ud fra standardkurven. Der fremstilles en ny standardkurve hver dag - dog kun med 2 replikater for hver koncentration.

Chromatografi:

Hvis hældningen på standardadditionskurven er forskellig fra kalibreringskurven, korrigeres for forskellen ved at anvende en responsfaktor. Responsfaktoren bør ikke være mindre end 0.8 (eller mere end 1.25).

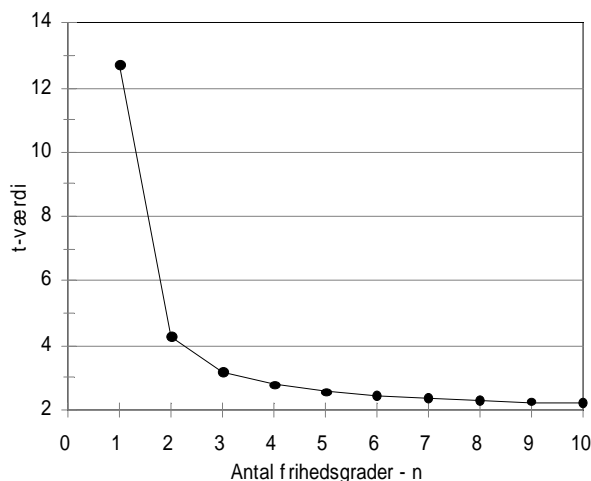
Det kontrolleres dagligt, at mindst én standard giver samme respons som under valideringen.

Præcision:

Repeatability beregnes på 3 niveauer som standardafvigelsen på 6 replikater på Kalibreringskurven – typisk inden for samme dag (intra-day præcision)..

Inter-day variation beregnes ved at medtage samme prøver på 2 niveauer i analyseserien på forskellige dage (mindst 3) Der måles to replikater, hvilket resulterer i totalt 6 målinger på hvert koncentrationsniveau. Herefter beregnes dag-til-dag-variationen.

(Baggrunden for de 6 replikater er at der ved dette antal opnås en betydelig mindre usikkerhed end ved færre målinger og flere målinger giver forholdsvis mindre effekt på usikkerheden, se figur 1)



Figur 1. t-værdier som funktion af antal frihedsgrader. 6 replikater svarer til 5 frihedsgrader.

Som udtryk for præcisionen anvendes ofte den relative standardafvigelse i % om beregnes ud fra formlen

$$RSD\% = \frac{100}{\bar{y}} \sqrt{\frac{\sum (y_i - \bar{y})^2}{n-1}}$$

Bestemmelsesgrænser, LOD og LOQ:

Detektions- og kvantiseringsgrænser bestemmes på en af de tre nedenstående måder. Mulighed 1 og 2

foretrækkes frem for mulighed 3.

Detektionsgrænsen (LOD) for en analysemetode er den mindste mængde (laveste koncentration) af analyt, der kan detekteres i en prøve. Eller med andre ord: den mængde (koncentration) af analytten, der giver et signal (Y), der kan skelnes fra støjen (blindsignalet).

Ifølge IUPAC definitionen: $Y = Y_B + 3s_B$

hvor Y er signalet, Y_B er middelværdien af blindsignalet og s_B er spredningen på blindsignalet.

I denne definition anvendes et signal/støj (S/N) forhold på 3.

Ved beregning af kvantiteringsgrænsen (LOQ) sættes faktoren til 10:

$$Y = Y_B + 10s_B$$

LOQ er den mindste mængde/laveste koncentration, der kan bestemmes kvantitativt med en given præcision. Er der tale om analyse af et farmaceutisk præparat skal præcisionen være høj, da grænserne for kvantitativt indhold normalt er snævre, men er der tale om analyse af biologiske matrices vil man kunne acceptere en relativ standardafvigelse på op til 15-20% ved LOQ.

Et estimat for s_B kan findes på flere måder:

Spektroskopiske metoder:

1. Der måles et antal replikater på blindværdien ($n=20$). Middelværdien Y_B og spredningen s_B beregnes. Signalværdien Y omsættes til koncentration v.h.j.a. regressionsliniens hældning, a:

$$LOD = (Y_B + 3s_B) / a$$

Hvis der ikke kan opnås signal for blindværdien, kan i stedet anvendes en opløsning af analytten i en lav koncentration (i nærheden af den forventede detektionsgrænse).

Hvis blindværdien (signalet af opløsningsmiddel, eluent el.lign) er nul, forenkles udtrykket til

$$LOD = 3s_B/a$$

og kvantiseringsgrænsen er tilsvarende

$$LOD = (Y_B + 3s_B) / a \quad \text{eller} \quad LOQ = 10s_B/a \quad (Y_B = 0)$$

Alle metoder:

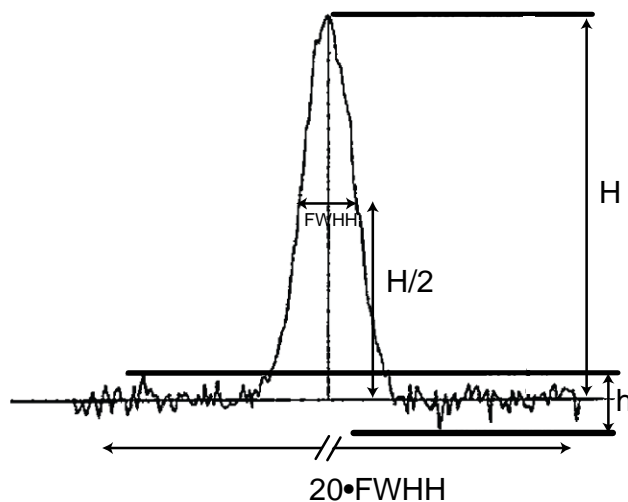
2. Detektionsgrænsen beregnes ud fra regressionslinien (kalibreringskurven):

Som estimat for s_B anvendes standardafvigelsen på regressionen og regressionsliniens hældning anvendes til at omsætte signal til koncentration .

Chromatografiske metoder:

3. Detektionsgrænsen beregnes efter en visuel vurdering af støjen:

a). jf. Ph.Eur.: "peak-to-peak noise" (=N) måles på basislinien i et område omkring toppen svarende til 20 gange toppens bredde i halv højde (se figur):



Signal/støj-forholdet beregnes ved hjælp af følgende formel:

$$S / N = \frac{2H}{h}$$

b). Basislinien optegnes med stor forstærkning, hvorefter der tegnes to parallelle linier, som omslutter støjen. Afstanden mellem disse linier betegnes "peak-to-peak noise", N_{p-p} . Spredningen estimeres som en femtedel af denne:

$$s_B = N_{p-p}/5$$

hvorefter detektionsgrænsen beregnes som ovenfor under 1.

Det skal bemærkes at metode 3a og 3b ikke giver helt det samme resultat, men man skal samtidig være opmærksom på at S/N -forholdet jo heller ikke er en fysisk konstant men er en værdi som er afhængig af en række parametre i det chromatografiske system.

Vigtigt

Efter beregning af detektionsgrænsen skal det altid efterprøves om denne er realistisk. Dette gøres ved at analysere en prøve med den beregnede koncentration og vurdere om signalet faktisk kan skelnes fra støjen.

Tilsvarende skal kvantiseringsgrænsen afprøves med en koncentration som ligger tæt på den estimerede værdi for at verificere at den relative standardafvigelse ikke overskrider den fastsatte grænse.

Nøjagtighed

Nøjagtigheden kan efterprøves på flere måder:

1. Analyse af et referencemateriale med et kendt certificeret indhold af analytten. Referencematerialet bør ligne den virkelige prøve meste muligt, således at analytkoncentration og matrix i prøve og referencemateriale er sammenlignelige.
2. Sammenligning af resultater med en uafhængig valideret analysemetode. Jo mindre de to metoder ligner hinanden - des bedre.

Hvis prøveforberedelse indgår som en del af analysemetoden, skal der udføres genfindingsforsøg (Recovery). Prøven spikes med analyt-standard på 3 koncentrationsniveauer med mindst 3 bestemmelser på hver (helst 5-6). Resultatet opgives som % recovery.

I mange tilfælde er dette den eneste mulighed for at afprøve nøjagtigheden. Det forudsættes så at denne prøve kombineret med anvendelse af sporbare standarder, anvendelse af kvalificeret apparatur samt de

øvrige dele af valideringen kan sandsynliggøre nøjagtigheden.

Selektivitet / (Specificitet)

Dette er det vanskeligste at undersøge. Hvis analysemetoden omfatter en separation - som HPLC - bør det undersøges om analytsignalet kun skyldes analytten. Hvis de mulige interferenser kendes (f.ex. synteseenheder, nedbrydningsprodukter eller metabolitter) og disse er tilgængelige, bør det påvises at disse ikke interfererer (falder sammen) med analytsignalet.

En måde at undersøge dette på er at anvende en diodearray detektor til at undersøge om analyt-toppen kun udviser ét UV-VIS spektrum under hele elueringen og at det er identisk med tilsvarende spektrum for referencestoffet. Alternativt kan LC-MS eller LC-NMR anvendes til at undersøge massespektrene, henholdsvis protonspektrene, under hele elueringen.

Der skelnes mellem selektivitet og specificitet, således at selektiviteten af en metode refererer til i hvilken grad metoden kan bestemme en eller flere analytter i en kompleks matrix uden interferenser fra andre tilstedeværende komponenter. En specifik metode, derimod, kan kun bestemme analytten. Specifikke metoder er sjældne og specificitet er næsten umuligt at bevise.

Robusthed

En analysemetodes robusthed beskriver, hvor pålideligt metoden fungerer over en længere tidsperiode under anvendelse af forskellige batcher af reagenser og anvendt af mange forskellige personer. Den umiddelbare robusthed kan testes ved systematisk at indføre små variationer i f.eks. temperaturen, de anvendte mængde af reagenser etc. Robusthed er derfor ikke videre beskrevet her.

Referencer.

- ICH guideline on validation of Analytical Procedures Q2(R1): - Text and Methodology. (step 4).
- IUPAC Compendium of Analytical Nomenclature. The Orange Book - 3rd Ed. J Inczedy, T. Lengyel, and A.M. Ure. Blackwell Science, 1998. ISBN 0-632-05127-2