

# Uvod u validaciju metoda analize lijekova

---

Medić-Šarić, Marica; Jasprica, Ivona; Debeljak, Željko

Source / Izvornik: **Farmaceutski glasnik, 2006, 62, 1 - 7**

**Journal article, Published version**

**Rad u časopisu, Objavljena verzija rada (izdavačev PDF)**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:550517>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-13**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



# Uvod u validaciju metoda analize lijekova

MARICA MEDIĆ-ŠARIĆ, IVONA JASPRICA i ŽELJKO DEBELJAK

Zavod za farmaceutsku kemiju, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu,  
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb

## UVOD

Analize sadržaja aktivne komponente, onečišćenja u sirovini ili gotovom obliku i druge metode instrumentalne kemijske analize lijekova, za koje ne postoje ili se ne primjenjuju standardizirani analitički postupci, nužno podliježu zahtjevu za ispitivanjem prikladnosti analitičkih svojstava metode za danu primjenu. Nasuprot tome, postupci analize određenih svojstava lijekova koji se provode prema standardiziranim farmakopejskim protokolima poput mikrobioloških analiza, bioloških pokusa i slično, rjeđe se podvrgavaju takvom postupku kojeg nazivamo validacijom metode. Validacija metoda analize lijekova (u daljnjem tekstu »validacija«) prema europskoj, japanskoj i američkoj farmakopeji sastavni je dio procesa registracije ljekovitih oblika ili farmakološki aktivnih tvari. Osnovni je element sustava osiguranja kvalitete i nužan preduvjet distribucije i terapijske primjene lijeka u Hrvatskoj i inozemstvu.

## ŠTO JE VALIDACIJA I KADA SE PROVODI

Validacija se definira kao postupak kojim se utvrđuje odgovara li djelotvornost neke metode zahtjevima za određenu analitičku primjenu (1). Temeljni uvjet za procjenu te djelotvornosti je izrada iscrpne dokumentacije o provedbi ispitivanja koja se sastoji od regulatorne dokumentacije koju propisuje odgovarajuće tijelo državne uprave ciljanog tržišta, protokola validacije, sirovih podataka validacijskih mjerenja, sažetka provedene validacije, prikaza obrade sirovih podataka s tabličnim i grafičkim analizama validacijskih parametara, te teksta validacijskog dokumenta.

Validacija se provodi:

- pri razvoju i uvođenju nove analitičke metode i
- pri izmjeni bilo kojeg dijela validirane analitičke metode (2-4).

Potrebno je istaći da su validacija i razvoj odnosno modifikacija analitičke metode procesi koji se ciklički izmjenjuju sve dok svi validacijski parametri ne zadovoljavaju zahtjeve

predviđene određenom regulativom. Proces kojim se analitička metoda razvija i validira može se podijeliti na nekoliko koraka:

- nabava ili priprema referentnog standarda te ciljanih uzoraka,
- utvrđivanje kriterija prihvatljivosti rezultata za pojedino ispitivanje i seriju uzoraka (specifikacija proizvoda),
- izbor prikladne instrumentacije,
- postavljanje prikladnih predanalitičkih i instrumentalnih uvjeta i eksperimentalnog dizajna,
- preliminarna razvojna mjerenja,
- utvrđivanje granica prihvatljivosti validacijskih parametara,
- postavljanje validacijskog protokola,
- validacijska mjerenja,
- obrada validacijskih rezultata,
- usporedba dobivenih rezultata s postavljenim kriterijima te donošenje odluke o prihvaćanju analitičkog postupka ili nastavku razvoja metode.

U određenim uvjetima, postupak validacije potrebno je ponoviti (revalidacija). Postupak validacije potrebno je ponoviti kod:

- promjene proizvodnog postupka sirovine ili formulacije,
- prenošenja metode iz jednog laboratorija u drugi,
- promjena analitičkih ili predanalitičkih parametara,
- promjene antikoagulansa prilikom uzimanja uzorka,
- promjene vrsta uzorka (npr. plazma umjesto urina),
- promjene instrumenata ili programskog paketa,
- isteka roka primjene metode (4).

Stupanj revalidacije ovisi o prirodi promjene. Do tada se analiza mora striktno provoditi prema validiranom postupku.

## VALIDACIJSKI POSTUPCI

Ovisno o namjeni analitičke metode razlikuju se i validacijski postupci. Pri tome se navedene razlike odnose kako na validacijski protokol, tako i na granice prihvatljivosti. Prema validacijskom protokolu, metode analize lijekova mogu se podijeliti u dvije velike skupine:

- kemijske i bioanalitičke instrumentalne analize tehnoloških svojstava poput određivanja sadržaja aktivne tvari ili kvantitativnog određivanja pojedinih onečišćenja sirovine ili gotovog proizvoda, te pretklinička i klinička ispitivanja farmakokinetičkih i farmakodinamskih svojstava ljekovitih tvari;
- kemijske i bioanalitičke instrumentalne analize tehnoloških svojstava prilikom »in process« kontrole.

Navedena podjela djelomično je ovisna i o izboru metode. Ona se prije svega odnosi na kromatografske metode. U novije se vrijeme u cilju utvrđivanja sadržaja, onečišćenja

ali i za karakterizaciju aktivne tvari sve češće uvode imunokemijske metode kao i specifični mikrobiološki testovi. Ove grupe metoda se posebno često primjenjuju u analitici tvari dobivenih rekombinantnom biotehnologijom. Iako su sve češće u primjeni, validacija spomenutih metoda još nije detaljno razrađena (4,5).

Unutar prethodno navedenih skupina nema značajnih razlika u validacijskim protokolima, ali mogu biti prisutne razlike s obzirom na granice prihvatljivosti. Navedene skupine metoda međusobno se značajno razlikuju prema vrsti validacijskih parametara, čime je posljedično određen i protokol validacije. Za drugu skupinu metoda obično se postavljaju znatno slabiji zahtjevi s obzirom na broj i vrstu validacijskih parametara koje se ispituje. Detaljni podaci dani su u literaturi (2,3), a u nastavku teksta bit će prikazani osnovni postupci ispitivanja najvažnijih validacijskih parametara.

Tekst analitičke metode mora detaljno opisivati svaki korak izvođenja analitičkog postupka i primjenjene tehnike. Ovisno o vrsti metode, tekst treba uključivati karakteristike uzorka, referentnog standarda, pripremu reagensa, opis instrumentalnih parametara pod kojim se provodi analiza i priprema uzorka, upotrebu određenih formula za računanje i dr.

## VALIDACIJSKI PARAMETRI

Namjena analitičke metode određuje validacijske značajke i parametre koji se procjenjuju. Tipični parametri koji se moraju ispitati i uzeti u obzir su:

1. točnost,
2. preciznost (repetibilnost, intermedijarna preciznost, reproducibilnost),
3. selektivnost,
4. granica detekcije (dokazivanja),
5. granica kvantifikacije (određivanja),
6. linearnost i područje mjerenja,
7. robustnost (otpornost) (3).

### TOČNOST (ISTINITOST)

Točnost (istinitost) analitičke metode izražava podudaranje dobivenih rezultata sa stvarnim. Pod pojmom »stvarni rezultati« podrazumijevaju se rezultati konvencionalno prihvaćeni kao točni ili referentne vrijednosti određenog standarda. Provodi se najmanje na pet koncentracijskih razina uz najmanje tri ponovljena mjerenja svakog uzorka određene koncentracijske razine. Odstupanja od stvarne vrijednosti najčešće se iskazuju kao postotak iskorištenja (*Recovery*, *R*):

$$R = C_{\text{exp}} / C_{\text{std}} \times 100 \%, \quad (3)$$

gdje su  $C_{\text{exp}}$  i  $C_{\text{std}}$  izmjerena i stvarna količina analita u uzorku.

## PRECIZNOST

Preciznost analitičke metode izražava se kao odstupanje (rasipanje) pojedinog rezultata mjerenja od srednje vrijednosti rezultata serija mjerenja višestrukog uzorkovanja istog homogenog uzorka pod strogo propisanim uvjetima. Pojam preciznosti može se razmatrati na tri nivoa: repetibilnost, srednja preciznost te reproducibilnost. Repetibilnost izražava preciznost metode izvedene pod istim uvjetima u kratkom vremenskom intervalu. Intermedijarna preciznost izražava varijabilnost unutar laboratorijskih uvjeta (poput različitih dana, analitičara i opreme kojom se provodi analiza), dok reproducibilnost označava postotak odstupanja rezultata dobivenih u različitim laboratorijima. Repetibilnost se ispituje najmanje devet puta, tri puta s po tri različite koncentracije koje pokrivaju raspon određene metode ili se provodi šest ispitivanja sa 100 % predviđene odnosno dozvoljene koncentracije analita u uzorku. Preciznost metode treba ispitivati koristeći homogeni, autentični uzorak. Ukoliko nije moguće ispitivanje provesti na homogenom uzorku, preciznost se može ispitati koristeći umjetno pripremljene uzorke ili otopine uzorka. Preciznost analitičke metode obično je iskazana kao varijanca, standardna devijacija ili koeficijent varijacije (relativna standardna devijacija) serije mjerenja.

## SELEKTIVNOST

Selektivnost analitičke metode definirana je kao sposobnost metode da kvantitativno odredi analit u prisustvu drugih komponenata u uzorku (poput onečišćenja, razgradnih produkata, pomoćnih sredstava). Nedostatak specifičnosti pojedine metode za određeni analit može se nadoknaditi zasebnim analitičkim metodama koje osiguravaju točan podatak o sadržaju onečišćenja analita, ostatka otapala i sl. Ispitivanje selektivnosti provodi se podvrgavanjem uzorka lijeka utjecaju različitih agresivnih supstancija poput kiselina, lužina, reducensa i oksidansa, fizikalnih agenasa poput visoke temperature i/ili vlage odnosno bioloških agenasa tipa jetrenih enzima ili kultura stanica. Interferencije u tako tretiranim uzorcima najpouzdanije se utvrđuju primjenom tehnika koje imaju veću selektivnost od validirane tehnike, npr. primjenom MS ili tandem MS detektora. Alternativno, tretirani uzorak može se analizirati pomoću više različitih modifikacija validirane metode tj. uz varijaciju analitičkih parametara koji utječu na selektivnost. Konačno, tretirani se uzorci mogu analizirati i primjenom potpuno različitih tehnika npr. primjenom GC-a ili CE-a u slučaju validacije na HPLC-u zasnovane metode. U svakom navedenom slučaju pojava većeg broja detektiranih specija u kontrolnom postupku može ukazivati na određene interferencije prisutne kod validirane metode.

## GRANICA DETEKCIJE (DOKAZIVANJE)

Granica detekcije (dokazivanja) predstavlja najmanju količinu analita u uzorku koja sa sigurnošću može biti detektirana (no ne nužno kvantificirana). Ovisno o tome da li je metoda instrumentalna ili ne, moguće je nekoliko pristupa određivanju granice detekcije:

- vizualna procjena se može koristiti za instrumentalne i ne-instrumentalne metode;
- granica detekcije određuje se analizom uzoraka poznate koncentracije analita do minimalne koncentracije koja se pouzdano može detektirati,

- detekcija prema omjeru signala i šuma primjenjiva je samo na metodama koje pokazuju šum bazne linije,
- standardna devijacija odziva i nagiba krivulje – granica detekcije (GD) može se izraziti kao:

$$GD = 3,3 \sigma / S, \quad (1)$$

gdje je  $\sigma$  standardna devijacija odziva, a  $S$  nagib kalibracijske krivulje. Nagib krivulje  $S$  može se procijeniti iz kalibracijske krivulje analita.

### GRANICA KVANTIFIKACIJE (ODREĐIVANJE)

Granica kvantifikacije (određivanja) predstavlja najmanju količinu analita koju kvantitativno možemo odrediti u nekom uzorku. Taj se parametar uglavnom određuje pri određivanju dozvoljene koncentracije onečišćenja i razgradnih produkata. Poput određivanja granice detekcije i granica kvantifikacije može se utvrditi na više načina:

- vizualna procjena se može koristiti za instrumentalne i ne-instrumentalne metode; granica kvantifikacije određuje se analizom uzoraka poznate koncentracije analita do minimalne koncentracije koja se može kvantitativno odrediti uz prihvatljivu točnost i preciznost metode,
- omjer signala i šuma,
- standardna devijacija odziva i nagiba krivulje – granica kvantifikacije (GK) može se izraziti kao:

$$GK = 10 \sigma / S, \quad (2)$$

gdje je  $\sigma$  standardna devijacija odziva, a  $S$  nagib kalibracijske krivulje. Nagib krivulje  $S$  se može procijeniti iz kalibracijske krivulje analita.

### LINEARNOST I PODRUČJE MJERENJA

Linearnost analitičke metode odražava njezinu sposobnost da rezultati analize budu direktno (linearno) proporcionalni količini analita prisutnog u uzorku. Kako bi se utvrdila linearnost metode, potrebno je metodu ispitati s najmanje pet različitih koncentracija. Linearnost metode se izražava koeficijentom korelacije, no metoda ne mora nužno biti linearna. Za metode s nelinearnim odzivom detektora broj točaka kojim se utvrđuje prikladnost kalibracijske krivulje mora biti najmanje šest (4).

Područje mjerenja označava interval između najviše i najniže količine analita u uzorku (uključujući i granične vrijednosti) za koje je dokazano da primjenjena analitička metoda ima zadovoljavajući nivo preciznosti, točnosti i linearnosti. Odstupanja od predviđene količine analita u uzorku se mogu značajno razlikovati, stoga je i područje mjerenja potrebno prilagoditi pojedinačnim primjenama validirane metode. Kod metoda s nelinearnom kalibracijom, kakve su npr. imunokemijske metode, nužno je postaviti donju i gornju razinu kalibracije u granice područja mjerenja, a u svrhu dobivanja zadovoljavajućih rezultata ostalih validacijskih mjerenja.

## ROBUSNOST (OTPORNOST)

Robustnost (otpornost) metode pokazuje koliko su rezultati mjerenja dobiveni tom metodom neosjetljivi na manje promjene radnih uvjeta mjerenja (kapacitet kompenzacije promjene radnih uvjeta). Izbor parametara za ispitivanje robustnosti izrazito ovisi o samoj metodi.

Validacijski parametri dviju ili više metoda mogu se međusobno uspoređivati metodom unakrsne validacije (*crossvalidation*). Unakrsna validacija koristi se za usporedbu rezultata dviju ili više metoda za jedno ili više ispitivanja. Primjer unakrsne validacije je usporedba originalno validirane metode (referentne metode) s metodom čiju primjenjivost ispitujemo (komparativna metoda). Kada se analiza uzorka odvija na više mjesta, unakrsna validacija standarda i uzoraka izvodi se u svakom laboratoriju kako bi se utvrdila pouzdanost interlaboratorijskih podataka. Unakrsna validacija se također koristi kada se podaci za određeni uzorak dobivaju korištenjem više analitičkih metoda (npr. HPLC-MS vs. ELISA).

Konačno, prije validacije metode potrebno je ispitati funkcionalnost korištene instrumentacije (*operational qualification*) kao i prikladnost čitavog analitičkog sustava (*system suitability*). Takvo ispitivanje temelji se na činjenici da instrumenti, analitičke operacije i uzorci čine cjelinu koja se kao takva procjenjuje. Parametre ispitivanja prikladnosti određenog sustava za analizu određuje vrsta metode koja se validira (2).

### **Korištene kratice:**

MS – spektrometrija masa

GC – plinska kromatografija

CE – kapilarna elektroforeza

HPLC – tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

ELISA – *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*

## ZAKLJUČAK

Validacija analitičkih metoda važan je čimbenik u osiguranju kvalitete analitičkih postupaka. Sve analitičke metode koje se koriste u dijagnostičke svrhe, u ekologiji, kao i metode za praćenje proizvodnje u farmaceutskoj industriji, nakon razrade moraju biti validirane. Svrha validacije je dokazati prikladnost metode upravo za određeno ispitivanje te dobiti zadovoljavajuće rezultate u propisanim uvjetima. Izbori parametara validacije i kriteriji prihvaćanja postavljeni su s obzirom na područje primjene metode. Najčešće ispitivani parametri u postupku validacije su: selektivnost, preciznost (repetibilnost, intermedijarna preciznost, reproducibilnost), granica detekcije, granica kvantifikacije, točnost, područje mjerenja, linearnost i robustnost (otpornost). Ovisno o zahtjevima metode, pojedini validacijski parametri mogu biti uključeni ili isključeni iz procesa validacije.

## Introduction to validation methods in drug analysis

by M. Medić-Šarić, I. Jasprica and Ž. Debeljak

### S u m m a r y

Validation of analytical procedures is an integral part of the drug registration process in the EU, Japan and the USA. Using specific laboratory tests, the validation process assesses that the performance characteristics of the investigated analytical method are suitable for the intended purpose.

The objective of the analytical procedure should be clearly understood since this will determine the validation parameters that need to be evaluated. Typical validation parameters to be considered are accuracy, precision (repeatability, intermediate precision), specificity, detection limit, quantification limit, linearity, range and robustness. On a case by case basis, some validation characteristics should be included or excluded.

### Literatura – References

1. M. Prošek, M. Pukl, Kvantitativna planarna kromatografija, Kemijski institut B. Kidrič, Ljubljana 1991.
2. International Conference on Harmonisation, Validation of Analytical Methods; Definitions and Terminology, <http://www.ich.org>.
3. International Conference on Harmonisation, Validation of Analytical Methods; Methodology, <http://www.ich.org>.
4. Food and Drug Administration (FDA), Guidance for Industry – Bioanalytical Method Validation, <http://www.fda.gov>.
5. J. W. A. Findlay, W. C. Smith, J. W. Lee, G. D. Nordblom, I. Das, B. S. DeSilva, M. N. Khan, Validation of Immunoassays for bioanalysis: a pharmaceutical industry perspective, J. Pharm. and Biomed. Anal., 21 (2000) 1249.

Primljeno: 28. 10. 2004.