



Opgemerkt

Richtlijnen voor analytische validatie

F.J. van de Vaart

Laboratorium der Nederlandse Apothekers,
's-Gravenhage

Evenals dat het geval is in een productie-omgeving wordt tegenwoordig ook van laboratoria geëist dat wordt gewerkt met gevalideerde methoden, dat wil zeggen dat onderzoeksgegevens beschikbaar zijn waaruit blijkt dat de methode geschikt is voor de beoogde toepassing. Dit is bijvoorbeeld het geval voor de methoden die deel uitmaken van registratiedossiers van farmaceutische producten. Ook in het kader van kwaliteitsborging voor laboratoria en certificering speelt validatie van analysemethoden in toenemende mate een rol.

Minder duidelijk is welke onderzoeksgegevens nu precies moeten worden verzameld alvorens een methode als 'gevalideerd' mag worden beschouwd. De studiegroep "Kwaliteit in de Farmaceutische Analyse" (KFA) heeft vanuit de behoefte hierover meer duidelijk te verkrijgen, een document opgesteld dat als titel "Validatie in de Farmaceutische analyse" mee-kreeg. Het opgestelde document heeft het karakter van een consensus en kan ook dienen als leidraad bij de validatie van onderzoeksmethoden in de farmaceutische analyse, zowel bij de studie als in het laboratorium bij de kwaliteitscontrole of de analyse in biologische matrices. Hoewel het document in eerste plaats farmaceutisch gericht is, zijn de principes en methoden algemeen toepasbaar in de analytische chemie.

De KFA bestaat uit 21 leden (zie Tabel 1) die afkomstig zijn uit onder andere de farmaceutische industrie, universitaire centra voor farmacie, overheids- en particuliere controlelaboratoria voor farmaceutische producten, en ziekenhuis-apotheken.

Voor nadere informatie over de KFA kan men zich wenden tot G.M. Overvliet, secretaris, tel.nr. 071-241700, of tot F.J. van de Vaart, voorzitter, tel.nr. 070-3624111. De integrale tekst van het document, opgesteld door de werkgroep, is hieronder weergegeven.

1. Inleiding

De studiegroep Kwaliteit in de Farmaceutische Analyse (KFA), die ressorteert onder de werkgroep Kwaliteit in de Analytische Chemie (KWAC) van de Koninklijke Nederlandse Chemische Vereniging (KNCV), heeft in 1991 uitvoerig studiege maakt en discussie gevoerd over analytische validatie. Het resultaat is voorliggend document.

Dit document beschrijft een aantal aspecten met betrekking tot de validatie van analysemethoden, waarover consensus bestaat binnen de studiegroep.

De consensus is gebaseerd op actuele inzichten en ontwikkelingen ten aanzien van validatie en sluit aan bij de officiële normen en richtlijnen op dit gebied.

Het toepassingsgebied omvat de analyse van farmaceutische grondstoffen al dan niet in toedieningsvormen (farma-analyse) en analyse van farmaca en metabolieten in biologische matrices (bio-analyse).

2. Bronnen

2.1. "Note for guidance on analytical validation", CPMP Working Party on Quality of Medicinal Products, 111/844/87-EN, august 1989.

2.2. "Nauwkeurigheid van metingen", termen en definities, NEN 3114, 2e druk augustus 1990.

2.3 "Validation of Compendial methods", USP XXII, pag. 1710-1712.

2.4 "General requirements for the competence of calibration and testing laboratories", ISO/IEC Guide 25, 3rd edition 1990.

2.5 Conferentie: "Analytical Methods Validation: Bioavailability, Bioequivalence and Pharmacokinetic Studies gehouden op 3 t/m 5 december 1990 in Washington DC, USA en georganiseerd door de American Association of Pharmaceutical Scientists (AAPS), de Food and Drug Administration (FDA), de Fédération Internationale Pharmaceutique (FID), de Health Protection Branch (HPB) en de Association of Official Analytical Chemists (AOAC).

Twee leden van de studiegroep KFA hebben deze conferentie bijgewoond.

3. Analytische validatie

3.1 Definitie

Validatie van een analysemethode is het aantonen dat de methode geschikt is voor de beoogde toepassing; dat wil zeggen voldoet aan de eisen die er met betrekking tot de toepassing aan gesteld worden.

3.2 Toelichting

Validatie dient inzicht te geven in de mogelijkheden en beperkingen (fouten en/of onzekerheden) van de methode.

Validatie vindt plaats door middel van gericht en systematisch onderzoek waarbij afhankelijk van de toepassing één of meer analytische parameters van de te valideren methode bepaald en aan de hand van criteria beoordeeld worden.

De definities van deze parameters en de algemene wijze waarop ze (kunnen) worden bepaald, staan hierna beschreven.

Een gevalideerde methode hoeft bij gebruik niet steeds volledig gehervalideerd te worden zolang daar geen directe aanleiding toe is. Wel dient een controle uitgevoerd te worden om te verifiëren dat de van belang zijnde parameters binnen de waarden vallen die bij het validatieonderzoek zijn vastgesteld. Een dergelijke verificatie wordt systeem-geschiktheidstest genoemd.

4. Validatieparameters, definities en toelichtingen

4.1 Validatieparameters

Deze parameters zijn:

- > juistheid
- > precisie
 - hierbij worden onderscheiden:
 - herhaalbaarheid
 - reproduceerbaarheid
- > specificiteit
- > selectiviteit
- > detectiegrens
- > bepalingsgrens
- > lineariteit
- > bereik
- > gevoeligheid
- > robuustheid

4.2 Definities en toelichtingen

Juistheid

Juistheid is de mate van overeenstemming tussen het gemiddelde van een reeks meetwaarden en de werkelijke waarde of de als werkelijk aangenomen waarde van de te bepalen grootte.

De werkelijke (= ware of absolute) waarde van een component is meestal niet exact bekend of te bepalen, daarom wordt in voorkomende gevallen met een als werkelijk aangenomen (= conventionele waarde) gewerkt zoals bij (internationale) referentiestandaarden.

NB: Het begrip nauwkeurigheid (van een analysemethode) is niet synoniem met juistheid. Nauwkeurigheid omvat juistheid en precisie, die achtereenvolgens betrekking hebben op de systematische afwijking en de toevallige afwijking van de ware waarde (NEN 3114). Het gebruik van het begrip nauwkeurigheid wordt ontraden.

Precisie

De precisie van een analysemethode is de mate van spreiding in de meetresultaten die verkregen worden door de methode een herhaald aantal malen onder vastgestelde condities op hetzelfde homogene monster uit te voeren.

Afhankelijk van de condities wordt onderscheid gemaakt tussen:

- * Herhaalbaarheid: dit is de precisie verkregen met dezelfde methode, op identiek materiaal, door dezelfde analist, met dezelfde meetapparatuur, op zo dicht mogelijk bij elkaar gelegen tijdstippen;
- * Reproduceerbaarheid: dit is de precisie verkregen met dezelfde methode op identiek materiaal onder variabele omstandigheden, d.w.z. door verschillende analisten, eventueel op verschillende laboratoria, met verschillende apparaten, met verschillende batches reagentia, op verschillende tijdstippen (grotere tussenpozen).

Bij reproduceerbaarheid gaat het dus om herhaling van de metingen onder maximale variatie van de in de procedure voorkomende spreidingsbronnen. Bij opgave van de aldus verkregen reproduceerbaarheid

moeten de omstandigheden dan ook exact en duidelijk vastgelegd worden.

Specificiteit en selectiviteit

Een analysemethode is specifiek als een methode alleen reageert op de te bepalen component.

Een analysemethode is selectief als de methode met gedefinieerde waarschijnlijkheid en juistheid, de te bepalen component kan onderscheiden van ontledingsproducten, onzuiverheden, verwante verbindingen en/of matrixcomponenten.

Selectief houdt in dat ook andere componenten kunnen bijdragen aan het signaal, maar dat de bepalingscondities zo gekozen zijn dat de bijdragen (interferenties) van de andere componenten geëlimineerd worden of binnen de foutenmarge vallen.

Detectiegrens

De detectie- of aantoonbaarheids-grens is de kleinste hoeveelheid stof die met gedefinieerde statistische waarschijnlijkheid met de analysemethode aangetoond kan worden.

Bepalingsgrens

De bepalingsgrens is de kleinste of grootste hoeveelheid stof die met de gedefinieerde precisie en juistheid met de analysemethode gekwantificeerd kan worden.

Lineariteit

De lineariteit van een analysemethode is de eigenschap dat binnen de bepalingsgrenzen er een rechtlijnig verband bestaat tussen de responsie en de hoeveelheid (concentratie) van de te bepalen component.

Bereik

Het bereik is het interval tussen de kleinste en de grootste hoeveelheid, concentratie, van de te bepalen component waarvoor de methode gevalideerd is.

Gevoeligheid

De gevoeligheid van een analysemethode is het vermogen om kleine

verschillen in hoeveelheid, concentratie, van de te bepalen component waar te kunnen nemen.

Robuustheid

Onder de robuustheid van een analysemethode wordt verstaan de ongevoeligheid van die methode voor (al of niet opzettelijke) variaties in de omstandigheden en de methodevariabelen bij de uitvoering.

De Robuustheid wordt beoordeeld door bewust (= bedoelde) kleine variaties in de uitvoering van de methode aan te brengen door bijvoorbeeld af te wijken van het voorschrift (andere DLC-plaat, ander kolommateriaal, andere pH, andere temperatuur, variaties in analysewachtijd etc). Dit vindt gewoonlijk plaats tijdens de ontwikkeling en/of optimalisering van een methode (methode variabel).

De reproduceerbaarheid wordt beoordeeld door de (geoptimaliseerde) methode zo exact mogelijk volgens voorschrift uit te voeren onder variabele omstandigheden (methode constant).

5. Het validatie-onderzoek

5.1 Toepassing

Validatie-onderzoek moet worden uitgevoerd bij:

- * nieuw ontwikkelde analysemethoden of procedures

- * wijzigingen in bestaande gevalideerde analysemethoden of procedures.

Nieuw ontwikkelde analysemethoden moeten zo volledig mogelijk in relatie met de toepassing en het doel gevalideerd worden.

De meeste validatieparameters worden onder optimale condities bepaald en vastgelegd na de ontwikkelings- en optimaliseringsfase. De basis voor het onderzoek naar de robuustheid wordt al gelegd tijdens de ontwikkeling en de optimalisering van de methode.

Wijzigingen in bestaande gevalideerde methoden moeten eveneens gevalideerd worden (hervalidatie). De wijziging kan betrekking hebben op zowel de methode als de omstandigheden van object, tijd en plaats.

Officiële methoden, waaronder die uit vigerende farmacopeeën, worden geacht gevalideerd te zijn, mits de methoden op de voorgeschreven wijzen toegepast worden voor het doel waarvoor ze gelden en is aangetoond dat aan alle voorwaarden voor correcte uitvoering is voldaan.

5.2 Uitvoering

De toepassing van de methode en de gebezigde analyse- of meettechniek bepalen welke aspecten of parameters gevalideerd moeten worden.

In bijlage 2 is een overzicht gegeven welke validatieparameters ten minste bepaald moeten worden bij bepaalde typen analytisch-chemische bepalingsmethoden, respectievelijk toepassingsgebieden. Dit overzicht is geenszins volledig en dient als leidraad.

6. Bepalingsmethoden van analytische validatie parameters

6.1 Algemeen

Voor het bepalen van de eerder genoemde validatie-parameters volgen hier een aantal standaardmethoden. Aangenomen wordt dat de steekproeven uit normaal verdeelde populaties afkomstig zijn. Indien blijkt dat niet aan deze voorwaarden is voldaan, dienen, voor zover mogelijk, parameter vrije toetsen uitgevoerd te worden.

Wat betreft het toepassingsgebied wordt onderscheid gemaakt tussen de analyse van farmaceutische grondstoffen al dan niet in toedieningsvormen enerzijds, de farma-analyse, en de analyse van farmaca en metabolieten in biologische matrices anderzijds, de bio-analyse.

Een aantal parameters, zoals juistheid en precisie, worden vaak kwantitatief vastgelegd als onjuistheid en imprecisie.

6.2 Bepaling van de juistheid

Mogelijke werkwijzen:

1. Recovery-onderzoek
2. Gebruik van referentiesubstantie
3. Vergelijk met een referentiemethode

6.2.1 Recovery-onderzoek

Principe:

De recovery (= terugvindbaarheid) van de te bepalen component(en) in de matrix wordt onderzocht met de te valideren methode.

Toepassingsgebied:

Toepassingsvormen, biologische matrices.

Methoden:

1. Proefmengselmethode, toepasbaar als de samenstelling van de matrix exact bekend is (farma-analyse).
2. Standaardadditiemethode, toe te passen als de samenstelling van de matrix niet of onvoldoende bekend is, (zowel bij farma-analyse als bij bio-analyse).

Voorwaarden:

De werkwijze is in beide gevallen overkomstig en moet aan de volgende voorwaarden voldoen:

* Er wordt een calibratielijn opgesteld.

Bij de bioanalyse is deze gebaseerd op ten minste 4 calibratiepunten in duplo of 8 in enkelvoud. Bij de farma-analyse zijn deze aantallen respectievelijk 3 en 6.

* De concentratie van de gekozen calibratiepunten zijn gelijkelijk verdeeld over het totale bereik en liggen niet buiten de bepalingsgrenzen.

* De matrix is ofwel placebo, proefmengselmethode, ofwel monster, standaard-additiemethode.

* In de calibratielijn wordt geen blanco matrix ("0"-standaard) meegenomen. Een blanco matrix kan wel meegenomen worden als controle, op het intercept.

* De lineariteit van de calibratielijn wordt bepaald.

* In geval van de standaardadditiemethode moeten vier verschillende toevoegingen worden

gedaan, waarbij de hoogste toevoeging een factor 4 hoger in concentratie moet zijn dan de verwachte concentratie.

6.2.1.1 Proefmengselmethode

Er worden tenminste 3 verschillende proefmengsels gemaakt met exact bekende concentraties van de te bepalen component(en) in een matrix die wat betreft samenstelling overeenkomt met die van het monster (placebo). Deze hoeveelheden liggen zowel op als onder en boven het te verwachten niveau van de te bepalen component.

Deze mengsels worden daarna elk in duplo geanalyseerd volgens de te valideren methode.

Er kan ook uitgegaan worden van 6 mengsels die elk in enkelvoud geanalyseerd worden.

De resultaten worden verwerkt door de bepaalde concentratie (y) uit te zetten tegen de toegevoegde concentratie (x) van de te bepalen component.

Op de resultaten kan lineaire regressie-analyse volgens de methode van de kleinste kwadraten worden toegepast. Er mag geen blanco matrix worden meegenomen in de berekening.

Voor de regressielijn

$y = ax + b$, waarin:

y = bepaalde concentratie,

x = toegevoegde concentratie,

a = intercept en

b = helling

kan gesteld worden dat in het ideale geval geldt:

a = 0 (de lijn gaat door de oorsprong)

b = 1 (recovery is 100 %).

Het percentage recovery is een maat voor de juistheid. Wanneer de richtingscoëfficiënt $b = 1$ is de recovery 100 %.

Het recovery-experiment geeft inzicht in drie typen fouten in de analysemethode:

1. Toevallige fouten. Deze geven een spreiding van de meetwaarden rond de regressielijn.

2. Constante systematische fout. Deze zorgt dat het intercept a significant van 0 afwijkt, mits de fout van a voldoende klein is.

3. Proportionele systematische

fout. Deze is afhankelijk van de concentratie en zorgt dat de helling significant van $b = 1$ afwijkt, mits de fout van b voldoende klein is.

No. 2. en 3. vormen aldus een maat voor de onjuistheid. De experimenteel gevonden waarden van a en b kunnen d.m.v. de daarvoor bestemde t -toetsen getoetst worden aan de theoretische waarden $a = 0$ en $b = 1$.

De formules voor deze t -toetsen zijn onder andere te vinden in: D.L. Massart, B.G.M. Vandeginste e.a., in "Chemometrics, a textbook", Elsevier 1988 - pag 53 ev -.

Opmerkingen

- * Indien een significante afwijking wordt gevonden dan kan deze verklaard worden uit genoemde systematische afwijkingen.

- * Het recovery-experiment kan zonnodig opgesplitst worden in verschillende recovery-experimenten voor de verschillende concentratiebereiken.

- * Aspecten als "onvolledige extractie" als gevolg van verschillen in fysische eigenschappen tussen het proefmengsel en de farmaceutische toedieningsvorm blijven met het recovery experiment door de proefmengselmethode onopgemerkt

6.2.1.2 Standaardadditiemethode

De uitvoering is analoog aan die bij de proefmengselmethode. In plaats van placebo wordt in dit geval het monster als matrix gebruikt.

Voor monsters van biologische herkomst wordt een concentratie van 4 maal de te verwachten hoeveelheid als hoogste punt in de validatie meegenomen.

In het ideale geval is de helling eveneens $b = 1$, maar het intercept is echter nu $a < 0$, ervan uitgaande dat de concentratie in het monster niet beneden de onderste bepalingsgrens ligt.

6.2.2 Gebruik van een referentiesubstantie

Principe:

De te valideren methode wordt in

6-voud toegepast op de referentiesubstantie, waarvan de samenstelling en het gehalte bekend en gecertificeerd zijn of te herleiden zijn op de officiële referentiesubstantie.

Toepassingsgebied:

Grondstoffen.

Uitvoering:

De te valideren methode wordt in 6-voud toegepast op de referentiesubstantie.

Berekening:

De gemiddelde uitkomst wordt statistisch vergeleken met de referentiewaarde (t -toets voor een populatiegemiddelde).

Indien een significant verschil gevonden wordt, is de grootte van het verschil een maat voor de onjuistheid van de methode.

Indien geen significant verschil gevonden wordt, wordt aangenomen dat de methode juist is.

6.2.3 Vergelijking met een referentiemethode

Principe:

De te valideren methode wordt vergeleken met een referentiemethode, voorzover beschikbaar, die onafhankelijk is van de te valideren methode.

Uitvoering:

Beide analysemethoden worden door dezelfde analist op 6 verschillende monsters in duplo uitgevoerd, zodanig dat gepaarde waarnemingen worden verkregen.

Toepassingsgebied:

Farma-analyse en bio-analyse.

Berekening:

De verschillen tussen de gepaarde waarnemingen worden statistisch getoetst (t -toets voor gepaarde waarnemingen).

Indien een significant verschil wordt gevonden, is de grootte van het verschil een maat voor de onjuistheid van de methode.

Indien geen significant verschil wordt gevonden, wordt aangenomen dat de methode juist is.

6.3 Bepaling van de precisie

Principe:

De precisie wordt bepaald door de standaarddeviatie van de methode onder vastgelegde condities te bepalen. Er wordt onderscheid gemaakt tussen herhaalbaarheid en reproduceerbaarheid. Beide parameters hebben betrekking op de totale uitvoering (methode + apparaat + analist). Daarnaast wordt in voorkomende gevallen nog de precisie van het systeem (apparaat, opstelling of onderdelen daarvan) bepaald.

6.3.1 Herhaalbaarheid

Uitvoering:

Er wordt onderscheid gemaakt tussen farma-analyse en bio-analyse als toepassingsgebieden.

Farma-analyse: de standaarddeviatie(s) wordt bepaald door uitvoering van de methode in tenminste 6-voud op hetzelfde monster onder zo gelijk mogelijke condities, dat wil zeggen door dezelfde analist, op hetzelfde apparaat, met dezelfde reagentia, op zo dicht mogelijk bij elkaar gelegen tijdstippen etc.

Bio-analyse: als bij farma-analyse op minimaal 3 concentraties (bij de onderste en de bovenste bepalingsgrens en halverwege daartussen), elk in minimaal 6-voud.

Berekening:

De resultaten worden uitgedrukt als:

- * herhaalbaarheids standaarddeviatie
- * herhaalbaarheids variatiecoëfficiënt (relatieve standaarddeviatie)
- * betrouwbaarheidsinterval van het gemiddelde ($\alpha = 0,05$)

6.3.2 Reproduceerbaarheid

Uitvoering:

Er wordt onderscheid gemaakt tussen farma-analyse en bio-analyse als toepassingsgebieden.

Farma-analyse: de standaarddeviatie(s) wordt bepaald door uitvoering van de methode in tenminste 6-voud op identiek materiaal onder de maximaal mogelijk variabele omstandigheden, dat wil zeggen door verschillende analis-

ten, in verschillende laboratoria, op verschillende apparaten, met verschillende reagentia etc.

Bio-analyse: als bij farma-analyse op minimaal 3 concentraties (bij onderste en bovenste bepalingsgrens en halverwege daartussen), elk in minimaal 6-voud.

Berekening:

De resultaten worden uitgedrukt als:

- * reproduceerbaarheids-standaarddeviatie
- * reproduceerbaarheids-variatiecoëfficiënt (relatieve standaarddeviatie).
- * betrouwbaarheidsinterval van het gemiddelde ($\alpha = 0,05$).

6.3.3 Precisie van het systeem

Uitvoering:

De standaarddeviatie wordt bepaald door in 6-voud een meting te verrichten met een standaardoplossing op het apparaat of onderdelen van de opstelling.

6.4 Bepaling van de specificiteit en de selectiviteit van de methode

6.4.1 Specificiteit

Principe:

Voor kwantitatieve doeleinden moet onderzocht worden of het gemeten signaal alleen afkomstig is van de te bepalen component.

Voor kwalitatieve doeleinden moet het identificerend of onderscheidend vermogen van een methode of een combinatie van methoden vastgesteld worden.

Uitvoering:

Farma-analyse: De beoordeling van de specificiteit van de analysemethode wordt in voorkomende gevallen uitgevoerd op proefmengsels (bij voorkeur bereid met verschillende batches grondstoffen) met verwante verbindingen, ontledingsproducten en onzuiverheden of op monsters die (eventueel op geforceerde wijze) ontleed of verouderd zijn.

Bio-analyse: Specificiteit bepalen in minimaal 6 onafhankelijke bronnen van de matrix.

6.4.2 Selectiviteit

Principe:

Als bij Specificiteit, waarbij vastgesteld moet worden in welke mate andere componenten in de matrix bijdragen aan het signaal.

Uitvoering:

Farma-analyse: Zie Specificiteit

Bio-analyse: De selectiviteit van de methode ten aanzien van endogene componenten, metabolieten en ontledingsproducten moet onderzocht worden.

6.5 Bepaling van de detectiegrens

Principe:

Met de te valideren methode wordt het laagst aantoonbare concentratieniveau vastgesteld.

Uitvoering:

Hierbij dient onderscheid gemaakt te worden tussen instrumentele en niet-instrumentele analyse.

► Instrumentele analyse: 2 mogelijkheden.

1. De detectiegrens wordt gelijk gesteld aan 2-3 maal de ruis.

2. De detectiegrens wordt gesteld op 3 maal de standaarddeviatie van het gemeten achtergrondsignaal (ruis) van tenminste 20 representatieve blanco-monsters (beschikking 90-515-EEG).

Ruis wordt veroorzaakt door snelle willekeurige fluctuaties in het detectorsignaal bij afwezigheid van de te meten component. Ruis wordt gemeten als het verschil tussen de maximale en minimale waarde van het blanco-meetsignaal, "peak to peak noise".

► Niet instrumentele-analyse: de detectiegrens kan hier bepaald worden door de analysemethode uit te voeren op bekende hoeveelheden (concentraties; afnemende reeks) van de te bepalen component en daarbij de minimale hoeveelheid

vast te stellen die met voldoende zekerheid gedetecteerd (waargenomen) kan worden. Bijvoorbeeld: visuele detectie bij DLC waarbij de opgebrachte hoeveelheden een afnemende (bij voorkeur meetkundige) reeks vormen.

De gevonden waarde voor de detectiegrens wordt geverifieerd door uitvoering van de bepaling op een monster of proefmengsel waarin de te bepalen component aanwezig is op het concentratieniveau van de vastgestelde detectiegrens.

6.6 Bepaling van de bepalingsgrens

Principe:

In de praktijk wordt op geleide van het toepassingsgebied een onderste en een bovenste bepalingsgrens gekozen. Daarvan wordt vastgesteld dat de bepaling met de vereiste juistheid en precisie uitvoerbaar is.

Bepaling van de onderste grens

Analoog aan de bepaling van de detectiegrens met dit verschil dat nu een factor 5-10 in plaats van 2-3 wordt toegepast.

Eisen voor de onderste bepalingsgrens:

Farma-analyse: vereiste juistheid en precisie afhankelijk van het concentratieniveau. Voor bijvoorbeeld verontreinigingen van minder dan 1 % is een precisie van maximaal 10 % toegestaan.

Bio-analyse: juistheid $\pm 15\%$ en een precisie van $\leq 20\%$.

Bepaling van de bovenste grens

Farma-analyse: bij toedieningsvormen op tenminste 1,25 maal de te verwachten concentratie.

Bio-analyse: op 2 maal de hoogst verwachte concentratie.

6.7 Bepaling van de lineariteit, het bereik en de gevoeligheid

6.7.1 Lineariteit

Principe:

Er wordt met behulp van een huis- of referentiestandaard een calibratielijns opgesteld op tenminste 4 verschillende concentratieniveaus tussen de onderste en de bovenste bepalingsgrens.

Uitvoering:

Alle meetpunten in duplo. De meetwaarden worden, zonedig na wiskundige transformatie met behulp van lineaire regressie (gewogen/ongewogen) verwerkt. In de berekening van de calibratielijns mag geen blanco- ("0"-concentratie) meegenomen worden.

Berekening:

Lineaire regressie met a als intercept en b de helling van de lijn: $y = a + bx$. De correlatiecoëfficiënt r wordt hier vaak ten onrechte geïnterpreteerd als maat voor de lineariteit (r is een maat voor de correlatie tussen x en y). De lineariteit kan statistisch getoetst worden met behulp van onder andere de F-toets (ANOVA).

6.7.2 Bereik

Dit is het onderzochte interval tussen onderste en bovenste bepalingsgrens.

Bij gebruik van een calibratielijns voor bepalingen in monsters moeten de concentraties binnen de range vallen. Extrapolatie is niet toegestaan. Indien de te meten concentraties niet binnen de range vallen, dient het monster verdund te worden (met blanco matrix) of minder monster in bewerking genomen te worden.

6.7.3 Gevoeligheid

De helling (b) van de regressie- of calibratielijns is een maat voor de gevoeligheid.

De waarde hangt af van de gekozen eenheden op de x - en y -as.

6.8 Bepaling van de robuustheid van de methode

Principe:

De basis voor het robuustheidsonderzoek wordt in het algemeen gelegd tijdens de ontwikkeling optimalisering van de meetmethode. In dit stadium wordt inzicht verkregen in de kritische eigenschappen van de methode.

Deze kennis geeft de mogelijkheid:

a. de methode zo goed mogelijk te beschrijven zodat reproduceerba-

re uitvoering is gewaarborgd.
b. indien nodig een geschikte "systeemgeschiktheidstest" op te zetten.

Het robuustheidsonderzoek vindt verder plaats na ontwikkeling en validatie van de methode.

Uitvoering:

Het robuustheidsonderzoek kan worden uitgevoerd door de potentiële kritische variabelen in de methode doelbewust binnen bepaalde grenzen te variëren en de invloed hiervan op het resultaat kwantitatief te beoordelen. De methode wordt hier dus binnen zekere grenzen opzettelijk gevarieerd.

6.9 Rapportage

Van het validatie-onderzoek wordt een apart rapport gemaakt, dat een eigen status heeft en voldoet aan vaste regels wat betreft opbouw, inhoud, beoordeling, goedkeuring en archivering.

7. Systeem-geschiktheidstest

Een systeem-geschiktheidstest is een test die direct voorafgaande aan of tijdens de uitvoering van een bepaling wordt uitgevoerd om te verifiëren of het systeem voldoet aan de eisen.

Een systeem-geschiktheidstest dient dus om te controleren of voldaan wordt aan de oorspronkelijke eisen die gesteld zijn bij het validatie-onderzoek.

De test bestaat uit de bepaling en beoordeling van één of meer methode parameters die, afhankelijk van de toegepaste analysetechniek en het doel van de bepaling bijvoorbeeld kunnen zijn: de resolutie, de lineariteit of de responsie.

Met name die methode-parameters, die kritisch zijn voor de bruikbaarheid (doelstelling), de betrouwbaarheid en de reproduceerbaarheid van de bepaling dienen in een systeem-geschiktheidstest te worden opgenomen.

Zolang niet aan de criteria van de systeem-geschiktheidstest wordt voldaan, zijn de resultaten niet betrouwbaar en moet het systeem geoptimaliseerd worden.

dit artikel is ook verschenen in het Pharmaceutisch Weekblad, jaargang 127 Nr. 46 1992