



validatie in de klinisch farmaceutische analyse

nader bekeken t.b.v. HPLC.

Ziekenhuis Rijnstate
Laboratorium Apotheek
Sjaak Melchers
Wagnerlaan 55
Postbus 9555
9800 TA Arnhem

Bij het opzetten van een kwaliteits-systeem binnen het laboratorium van de apotheek komt vanzelfsprekend de validatie van apparatuur en/of methoden aan de orde. De vragen die daarbij vaak gesteld worden zijn: "Hoe diep moet je gaan?", "Wat doen we wel en wat doen we niet?" en "Hoeveel tijd wil ik eraan besteden?". De laatste vraag wordt vaak ten

onrechte gesteld omdat de voor validatie benodigde tijd na verloop van tijd weer wordt terug verdiend, omdat bij gebruik van een gevalideerde methode geen kalibratielijnen meer opgenomen hoeft te worden (uitsluitend controles). Na validatie beschikt men bovendien over een schat aan informatie over de *gevalideerde* apparatuur en/of methode. Uitgebreide richtlijnen voor de validatie zijn verschenen in maart 1992 in de publicatie van de studiegroep Kwaliteit in de farmaceutische analyse van de werkgroep Kwaliteit in de analytische chemie, Sectie Analytische Chemie van de KNCV, met als voorzitter Dr. F.J. van der Vaart.

Deze publicatie is eveneens te vinden in het Pharmaceutisch Weekblad nr. 46 uit 1992. Het toepassen van de richtlijnen bij de validatie van een HPLC-bepaling levert in de praktijk toch de nodige problemen op. In dit artikel wordt getracht deze problemen te inventariseren en worden er, indien mogelijk, oplossingen aangedragen. De onderdelen van de validatie zijn juistheid, precisie, specificiteit, selectiviteit, detectiegrens, bepalingsgrens, lineariteit, bereik, gevoeligheid, robuustheid, rapportage en de systeemgeschiktheidstest. De cursieve tekst komt nagenoeg letterlijk uit de eerdergenoemde publicatie.

1 JUISTHEID:

Bij het bepalen van de juistheid zijn er drie mogelijke werkwijzen:

- 1 *Recovery-onderzoek*
- 2 *Gebruik van referentiesubstantie*
- 3 *Vergelijking met een referentiemethode*

Aangezien er meestal geen gecertificeerde referentiesubstanties in de handel verkrijgbaar zijn en omdat er meestal geen onafhankelijke referentiemethode voorhanden is, blijft het recovery-onderzoek als enige werkwijze over.

1.1 Recovery-onderzoek:

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

Bij het recovery-onderzoek kan gekozen worden uit twee methoden:

1.1.1 Proefmengselmethode:

Toepasbaar als de samenstelling van de matrix exact bekend is.

1.1.2 Standaardadditiemethode:

Toe te passen als de samenstelling van de matrix niet of onvoldoende bekend is.

Bij de standaardadditie moet een hoeveelheid matrix (=serum) en dezelfde hoeveelheid matrix met drie verschillende addities in duplo worden opgewerkt voor het verkrijgen van de kalibratielij.

Dit houdt dus in dat een grote hoeveelheid serum benodigd is. Hierdoor is de standaardadditiemethode in de praktijk nauwelijks mogelijk. Daarnaast is deze methode erg bewerkelijk.

Praktisch gezien is de proefmengselmethode het meest geschikt.

Kalibratielij:

Voorwaarden:

- A *De kalibratielij wordt gebaseerd op vier kalibratiepunten in duplo of acht in enkelvoud.*
- B *De concentraties van de kalibratiepunten zijn gelijkelijk verdeeld over het totale bereik en liggen niet buiten de bepalingsgrenzen.*
- C *In de kalibratielij wordt geen blanco-matrix (standaard 0) meegenomen.*

Hooguit als controle op het intercept van de berekende kalibratielij.

D De lineariteit van de kalibratielij wordt berekend.

De lineariteit van de kalibratielij wordt statistisch bepaald met Lack Of Fit (LOF) en Goodness Of Fit (GOF).

Hiertoe moet variantieanalyse worden toegepast, waarvoor duplowaarden benodigd zijn. De kalibratielij moet dus bestaan uit vier kalibratiepunten in duplo.

Voor het berekenen van het betrouwbaarheidsinterval, het tolerantie-interval, correlatiecoëfficiënt en de fouten in de diverse berekende waarden van de kalibratielij moet de kleinste-kwadratenmethode worden toegepast.

Zowel bij de variantieanalyse als bij de lineaire regressie kan standaard 0 niet in de berekening worden meegenomen.

Omdat, bij een bepaling nadat validatie heeft plaatsgevonden, geen kalibratielij meer meegenomen hoeft te worden, kost het eenmalig opwerken van vijf of zes (i.p.v. 4) kalibratiepunten in duplo weinig extra moeite. Hierdoor wordt wel een kalibratielij met een grotere betrouwbaarheid verkregen. Bovendien kunnen dan eventuele uitbijters worden weggelaten.

De spreiding van de meetwaarden rond de regressielijn wordt veroorzaakt door toevallige fouten.

Een constante systematische fout veroorzaakt een significante afwijking van het intercept van 0, mits de fout van a voldoende klein is.

Als de helling van de lijn gelijk is aan 1, dan is de recovery 100%. Als de helling significant afwijkt van 1, dan is er sprake van een proportionele systematische fout.

1.1.1 Proefmengselmethode:

Er worden drie verschillende proefmengsels gemaakt met exact bekende concentraties van de te bepalen component(en) in dezelfde matrix. Deze zijn te omschrijven als Low, Medium en High. Bepaal deze in duplo. Of bepaal zes verschillende mengsels in enkelvoud. Zet de bepaalde concentraties (y) uit tegen

de toegevoegde concentraties (x) van de te bepalen component. Hierdoor ontstaat een zogenaamde recovery-lijn.

Op de resultaten kunnen weer de statistische analyses worden toegepast, zoals die zijn toegepast op de kalibratielij. Daarvoor zijn wederom duplowaarden benodigd en moet wederom de kalibratielij uit vier punten bestaan. Met de t-toets worden experimenteel gevonden waarden van de helling en het intercept getoetst aan de theoretische waarden.

Nadeel van deze proefmengselmethode is dat de extractieopbrengst van de methode niet wordt bepaald, hetgeen net zo goed belangrijk is. Er wordt bovendien niet gerept over het gebruik van een interne standaard. Er valt dus voor te pleiten om deze methode om te dopen in de **extractieopbrengstmethode**:

Maak vijf of zes kalibratiepunten met als matrix de loopvloeistof van het HPLC-systeem (=eluens-kalibratiepunten). Zorg er daarbij voor dat de concentraties overeenkomen met de concentraties van de serum-kalibratiepunten, rekeninghoudend met de concentreringsfactor van de opwerking. Werk kwantitatief. Zet het signaal van de component(en) in de eluenskcalibratiepunten (x) uit tegen het signaal van de component(en) in de serumkalibratiepunten (y). Corrigeer eventueel voor de verliesfactor van de opwerking. Hierdoor ontstaat de zogenaamde extractieopbrengstlijn. Wederom kunnen de statistische analyses worden verricht. Als LOF en GOF voldoen aan de eisen, dan geeft de helling van deze lijn (x 100%) de extractieopbrengst over het hele bereik. Ook hier is de bovenstaande bespreking - onder Kalibratielij - met betrekking tot het soort fout van toepassing.

2 PRECISIE:

De precisie wordt bepaald door de standaarddeviatie, variatiecoëfficiënt en betrouwbaarheidsinterval van de methode onder vastgelegde condities te bepalen. Er wordt onderscheid gemaakt tussen HERHAALBAARHEID, REPRODUCEERBAARHEID en SYSTEEMPRECISIE.

2.1 Herhaalbaarheid:

De standaarddeviatie wordt bepaald door uitvoering van de methode van minimaal drie verschillende concentraties (L, M en H) in zesvoud onder zo gelijk mogelijke condities, d.w.z. door dezelfde analist, op hetzelfde apparaat, met dezelfde reagentia, op zo dicht mogelijk bij elkaar gelegen tijdstippen etc.

Van de resultaten worden herhaalbaarheidsstandaarddeviatie, herhaalbaarheidsvariatiecoëfficiënt en het betrouwbaarheidsinterval van het gemiddelde berekend ($\alpha=0,05$).

2.2 Reproduceerbaarheid:

Hier is dezelfde beschrijving van toepassing als bij de herhaalbaarheid, met dien verstande dat de uitvoering plaats vindt onder de maximaal mogelijke variabele omstandigheden, d.w.z. door verschillende analisten, in verschillende laboratoria, op verschillende apparaten, met verschillende reagentia etc.

Met betrekking tot de laboratoria valt op te merken dat dit in de praktijk (nog) niet te verwezenlijken valt.

2.3 Systeemprecisie:

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

Deze drie onderdelen geven goed inzicht in de precisie van de methode en het systeem. Om volledig te zijn zou er ook moeten worden getest op uitbijters.

3 SPECIFICITEIT EN SELECTIVITEIT:

3.1 Specificiteit:

Is het gemeten signaal afkomstig van de te bepalen component? Om dit te kunnen bepalen moeten uit zes onafhankelijke bronnen afkomstige matrices (serum van zes verschillende patiënten) worden opgewerkt.

Al zouden er geen storende signalen gevonden worden bij het opwerken van serum van honderd verschillende personen, dan geeft dit nog niet de garantie dat de methode specifiek genoeg is. Bij iedere patiënt moet bekeken worden hoe het is

gesteld met de piekvorm en/of piekzuiverheid.

3.2 Selectiviteit:

Hier wordt vastgelegd in welke mate andere componenten in de matrix bijdragen aan het signaal.

Als er een storende component gevonden wordt, dan is de identiteit van deze component meestal onbekend. De bijdrage van het signaal van deze storende component aan het signaal van de te bepalen component is dan niet te kwantificeren. In het gunstigste geval kan m.b.v. slimme integratie de bijdrage worden geëlimineerd. In het ongunstigste geval kan er geen uitslag worden geproduceerd.

Samenvattend kan worden gezegd dat dit hele hoofdstuk in de validatie van de klinisch, farmaceutische analyse mag worden weggelaten als er geen storende componenten aanwezig zijn.

4 DETECTIEGRENSEN

Om de detectiegrens te kunnen definiëren volgt nu eerst de definitie van ruis.

Ruis:

Ruis wordt gevormd door snelle fluctuaties in het detectorsignaal bij afwezigheid van de te bepalen component. Ruis wordt gemeten als het verschil tussen de maximale en minimale waarde van het blanco-meetsignaal ("peak-to-peak-noise").

De verschillende leveranciers van HPLC-apparatuur hebben in de meeste gevallen de bijbehorende software voorzien van een zogenaamde noise-bepaling. Het resultaat van deze noise-bepaling is niet gelijk aan de peak-to-peak-noise. Voor deze noise-bepaling moet een representatief stukje basislijn gemarkeerd worden. In dit gedeelte wordt middels de kleinste-kwadratenmethode de beste lijn door de datapunten gefit. Van elk punt wordt de afstand tot deze lijn bepaald. Van deze afstanden wordt de standaarddeviatie ($=\sigma$) bepaald.

In het ideale geval zullen alle toppen en dalen in de basislijn als gevolg van de snelle fluctuaties in het detectorsignaal twee imaginaire lij-

nen raken. In dit geval is de peak-to-peak-noise gelijk aan 2σ .

In de praktijk zal de peak-to-peak-noise groter zijn dan 2σ .

Hiermee is een verband gelegd tussen peak-to-peak-noise-methode en de σ -methode.

Detectiegrens:

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

Bij de instrumentele analyse zijn er twee mogelijkheden om de detectiegrens te bepalen.

- 1 De detectiegrens wordt gelijk gesteld aan twee tot drie maal de ruis.
- 2 De detectiegrens wordt gesteld op drie maal de standaarddeviatie van de ruis van tenminste 20 representatieve blanco-monsters.

De tweede mogelijkheid is arbeidsintensief. Daarnaast zal het niet meevallen om 20 representatieve blanco-monsters te verkrijgen. Resterende eerste mogelijkheid.

In de HPLC-software is de detectielimiet vaak gesteld op 5σ (=default-waarde).

In "Chemometrics, a textbook" van Masard staat eveneens 5σ vermeld.

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.

Eisen worden niet genoemd. Ook wordt een visuele (subjectieve) beoordeling niet genoemd. Om objectief de detectielimiet te verifiëren zouden statistische analyses moeten worden uitgevoerd op de resultaten van het in zesvoud bepaalde proefmengsel. Deze aanpak is nogal overdreven omdat een signaal groter dan de detectiegrens, maar kleiner dan de onderste bepalingsgrens, uitsluitend aantoonbaar mag worden genoemd. Concluderend lijkt bepalen van de detectielimiet op basis van de peak-to-peak-noise-methode of de softwarematige noise-bepaling voldoende.

5 BEPALINGSGRENS:

Analoog aan de bepaling van de detectiegrens met dit verschil dat nu een factor van vijf tot tien in plaats van twee tot drie wordt toegepast. In "Chemometrics, a textbook" van Masard staat 10σ vermeld. Dit komt overeen met vijf maal de peak-to-peak-noise. Tien maal de peak-to-peak-noise is dus aan de hoge kant.

Eisen onderste bepalingsgrens: juistheid $\pm 15\%$, precisie $\leq 20\%$.

Eisen bovenste bepalingsgrens: op 2 maal de hoogst verwachte concentratie.

5.1 Onderste bepalingsgrens:

Omdat een signaal groter dan de onderste bepalingsgrens gekwantificeerd mag worden, is het verstandig om hier wel wat meer aandacht te besteden aan de juistheid en de precisie.

Om de onderste bepalingsgrens te verifiëren, moet in zesvoud een proefmengsel met de bewuste concentratie worden bepaald. Van de verkregen resultaten worden standaarddeviatie, variatiecoëfficiënt en betrouwbaarheidsinterval berekend. Er kan op uitbijters worden getest. De variatiecoëfficiënt mag niet groter zijn dan 20%. De theoretische concentratie moet binnen het betrouwbaarheidsinterval liggen. Het betrouwbaarheidsinterval mag volgens de publicatie niet groter zijn dan het gemiddelde $\pm 15\%$.

5.2 Bovenste bepalingsgrens:

Als met "hoogst verwachte concentratie" de bovengrens van de therapeutische range wordt bedoeld, dan moeten monsters met een concentratie groter dan twee maal deze bovengrens, zoals bij een intoxicatie het geval is, voor het uitvoeren van de bepaling worden verdund. Of er moet minder monster worden meegenomen in de bepaling. Dit omdat extrapolatie niet is toegestaan.

Als met "hoogst verwachte concentratie" de toxische waarde wordt bedoeld, dan wordt het bereik van de kalibratielijng groot. Dit heeft tot gevolg dat het gebied waarbinnen de therapeutische spiegels liggen, niet meer rond het zwaartepunt van de kalibratielijng ligt en aangezien het betrouwbaarheidsinterval in het zwaartepunt van de kalibratielijng het

kleinst is, is de betrouwbaarheid van deze spiegels daardoor kleiner.

De auteur zal derhalve met "hoogst verwachte concentratie" waarschijnlijk de bovengrens van de therapeutische range hebben bedoeld.

Bij de bepaling van detectiegrens en bepalingsgrens moet worden gewerkt met piekhoogten. Bij het bepalen van farmaceutische spiegels moet worden gewerkt met piekopervlakten.

6 LINEARITEIT, BEREIK EN GEVOELIGHEID:

6.1 Lineariteit:

Zie onderdeel 1 JUISTHEID: Kalibratielijng.

6.2 Bereik:

Dit is het onderzochte interval tussen onderste en bovenste bepalingsgrens.

Hier worden uitsluitend eerder gevonden waarden samengevoegd.

6.3 Gevoeligheid:

Definitie: De gevoeligheid van een analysemethode is het vermogen om kleine verschillen in hoeveelheid (concentratie) van de te bepalen component waar te kunnen nemen.

De helling van de regressie- of kalibratielijng is een maat voor de gevoeligheid. De waarde hangt af van de gekozen eenheden op de x- en y-as.

Bij grafische weergave hangt de waarde van de helling van de kalibratielijng inderdaad af van de indeling van de assen.

In de wiskundige vergelijking ($Y = A + B \cdot X$) van de kalibratielijng is de richtingscoëfficiënt (B), binnen het gekozen concentratiebereik en bij de gekozen bepalingswijze van het signaal (piekhoogte; μV of piekopervlakten; $\mu V/s$), een vast gegeven.

Bij het gebruik van een interne standaard is de helling van de kalibratielijng geen maat meer voor de gevoeligheid van de detector, omdat bij afname van de gevoeligheid van de detector het signaal van zowel de interne standaard als van de te bepalen component zal afnemen. Omdat de ratio tussen de piekopervlakten van de te bepalen component en de interne standaard wordt uitgezet bij verschillende concentraties van de te bepalen component, is de richtingscoëfficiënt van de kalibratielijng een maat geworden voor de gevoeligheid van de bepalingsmethode ten opzichte van de interne standaard met een gekozen concentratie.

De basis voor het robuustheidsonderzoek wordt in het algemeen gelegd tijdens de ontwikkeling en optimalisering van de meetmethode. 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.

7 ROBUUSTHEID:

Omdat er bij een klinisch farmaceutische bepaling met behulp van HPLC een groot aantal kritische variabelen een rol spelen, is het vrijwel onmogelijk om het effect van variaties in deze variabelen of combinaties ervan vast te stellen. Het effect van variaties van de kritische variabelen speelt geen rol als de bepaling exact wordt uitgevoerd. Het robuustheidsonderzoek heeft bij bio-equivalentiestudies geen verplicht karakter.

Omdat er bij een klinisch farmaceutische bepaling met behulp van HPLC een groot aantal kritische variabelen een rol spelen, is het vrijwel onmogelijk om het effect van variaties in deze variabelen of combinaties ervan vast te stellen.

Het effect van variaties van de kritische variabelen speelt geen rol als de bepaling exact wordt uitgevoerd. Het robuustheidsonderzoek heeft bij bio-equivalentiestudies geen verplicht karakter.

8 SYSTEEMGESCHIKTHEIDSTEST:

De systeemgeschiktheidstest 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.

De hier genoemde eisen kunnen betrekking hebben op ruis, drift, resolutie, schotelgetal, capaciteitsfactor, signaal-ruisverhouding, piekbreedte, relatieve retentietijd ten opzichte van de vorige piek (α), piekhoogte en/of piekopervlakte en tailing.

In de software van moderne HPLC-apparatuur is meestal een programma-onderdeel voor geautomatiseerde berekening en rapportage voor deze systeemgeschiktheidstest te vinden.

9 RAPPORTAGE:

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

Het validatierapport kan als afzonderlijk onderdeel worden opgenomen in het logboek van de HPLC-opstelling.

Het rapport moet bestaan uit de volgende onderdelen:

- Titelblad
- Inhoudsopgave
- Samenvatting
- Wanneer opnieuw valideren
- Verantwoording
- Gebruikte apparatuur
- Normen en eisen
- Beschrijving validatie:
 - Veronderstellingen
 - Injectieschema validatie HPLC-bepaling
 - Opmerkingen m.b.t. injectieschema
 - Overige opmerkingen

- Gebruikte statistische formules
- Tabellen met resultaten (incl. ruwe data)
- Resultaten statistische analyses

10 TOT SLOT

Het valideren van een HPLC-methode vereist analytisch inzicht. De statistische verwerking vereist een gedegen inzicht in de statistiek. Aangezien tijdens het uitvoeren van de validatie een grote hoeveelheid data wordt geproduceerd, komt een rekenprogramma goed van pas. De bestaande statistische pakketten kunnen echter geen compleet rapport genereren. Het ontwikkelen van een spreadsheet ligt dan ook voor de hand. Hiervoor is een diepgaande vertrouwdheid met bijvoorbeeld Excel of Lotus onontbeerlijk.

Ondergetekende is eind 1996 schoorvoetend begonnen met het opzetten van de validatie van HPLC-apparatuur binnen het laboratorium van de apotheek van Ziekenhuis Rijnstate. Gaandeweg werd de

noodzaak van het hebben van 'een spreadsheet op maat' duidelijk. In de spreadsheet kunnen de bij de validatie verkregen gegevens worden ingevoerd. Na een druk op een knop wordt een rapport (twintig pagina's) geproduceerd. Het ligt in de bedoeling om dit spreadsheet in de nabije toekomst te converteren naar Excel. Het is niet ondenkbaar dat andere laboratoria interesse hebben in dit Lotus-spreadsheet (of Excel).

Het organiseren van een workshop met betrekking tot de Lotus-spreadsheet behoort tot de mogelijkheden. Tijdens deze workshop zullen onderwerpen als theoretische achtergrond, implementatie op het laboratorium en gebruik van dit spreadsheet worden behandeld. Het spreekt voor zich dat de workshop alleen zal worden georganiseerd bij voldoende inschrijvingen.

Voor meer informatie en/of een inschrijfformulier kan men de auteur benaderen.