

Metody kontroly technologických procesů

vývoj analytických metod, nadstavba analytické chemie se zaměřením na průmyslové procesy



Janette Bobářová
Ústav analytické chemie AV ČR, v.v.i., Veveří 97, 602 00 BRNO

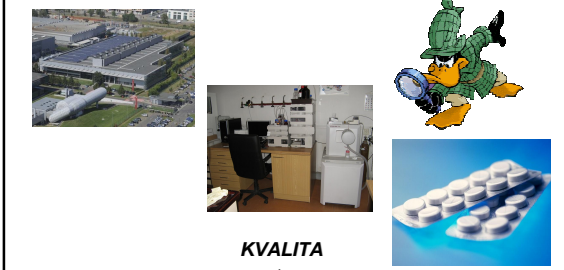
iac brno

OBSAH

- I. Výrobní proces
- II. Správná výrobní praxe
- III. Validace analytických procedur - příklad HPLC
- IV. Kvalifikace přístrojů
- V. Kalibrace a údržba laboratorních přístrojů
- VI. Přenos analytických metod

Janette Bobářová
Metody kontroly technologických procesů

iac brno



KVALITA

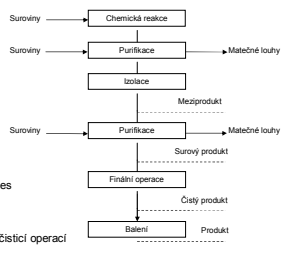
↓

Vývoj analytických metod/systémů ↔ Validace analytických metod/systémů

Janette Bobářová
Metody kontroly technologických procesů

iac brno

I. VÝROBNÍ PROCES



Výrobní proces začíná:

- příjem surovin
- jejich kontrolou
- kontrolou výrobního zařízení

Dalším krokem je:

- chemická reakce
- v případě biotechnologické výroby bioprocес

Po chemické reakci následuje:

- izolace vzniklého meziproduktu
- izolace meziproduktu je většinou zároveň čistící operací

Poslední operací:

- balení

Během celého procesu jsou prováděny:

- procesní kontroly
- konečné kontroly

Janette Bobářová
Metody kontroly technologických procesů

iac brno

Záznamy o laboratorních kontrolách – mají obsahovat následující údaje:

- popis vzorku včetně názvu materiálu, číslo šarže, data odběru vzorku a resp. množství a datum dodání vzorku
- úplný záznam všech prvotních dat každého testu (grafy, kontrolní archy a spektra) s uvedením testovaného materiálu a šarže
- záznamy všech výpočtů včetně jednotek a faktorů
- výsledky testu a srovnání se stanovenými specifikacemi
- datum každého testu a podpis osoby, která ho provedla
- datum a podpis další osoby dokazující, že originální záznam byl zkontrolován na správnost, úplnost a shodu se specifikacemi

Úplné záznamy mají být rovněž uchovávány pro následující činnosti:

- všechny modifikace předepsané analytické metody
- periodické kalibrace laboratorních přístrojů, aparatur, měřidel a záznamových zařízení
- setření výsledků mimo limity

Janette Bobářová
Metody kontroly technologických procesů

iac brno

II. SPRÁVNÁ VÝROBNÍ PRAXE – GMP

Současné požadavky GMP pro substance, které jsou označovány jako: **API (Active Pharmaceutical Ingredients)** nebo **BPC (Bulk Pharmaceutical Chemicals)** jsou dle předpisu ICH Q7A „Good Manufacturing Practice for Active Pharmaceutical Ingredients“ (Správná výrobní praxe pro farmaceutické účinné látky) rozděleny do následujících oblastí:

1. Úvodní informace
2. Řízení jakosti
3. Personál
4. Budovy a provozní zařízení
5. Procesní výrobní zařízení
6. Dokumentace a záznamy
7. Materiálový management
8. Výroba a průběžné výrobní kontroly
9. Balení a značení produktu a meziproduktů
10. Skladování a distribuce
11. Laboratorní kontroly
12. Validace
13. Kontrola řízení změn
14. Zamítnutí a nové použití materiálu
15. Reklamacce a stahování z oběhu
16. Smluvní výrobci
17. Prodejci, distributoři a předřikování
18. Specifické směrnice pro substance vyráběné buněčnými kultivacemi nebo fermentací
19. Substance pro klinické studie
20. Slovník

Janette Bobářová
Metody kontroly technologických procesů

iac brno

Druh výroby	Apkace GMP na výrobní kroky				
	Produkce výchozího materiálu	Zavedení výchozího materiálu do procesu	Produkce mezproduktů	Isolace a purifikace	Fyzikální zpracování a balení
Chemická výroba					
API extrahovaná z rostlinných zdrojů	Sběr rostlin	Řezání a prvotní extrakce	Zavedení výchozího materiálu do procesu	Isolace a purifikace	Fyzikální zpracování a balení
API ze živočišných zdrojů	Sběr orgánů, tekutin nebo tkání	Řezání, směšování nebo prvotní zpracování	Zavedení výchozího materiálu do procesu	Isolace a purifikace	Fyzikální zpracování a balení
Biotechnologie/fermentace Buněčná kultivace	Ustavení řídicí buněčné banky a pracovní buněčné banky	Uchování pracovní buněčné banky	Buněčná kultura nebo fermentace	Isolace a purifikace	Fyzikální zpracování a balení
„Klasická“ fermentace pro produkt API	Ustavení buněčné banky	Uchování buněčné banky	Zavedení buněk do fermentace	Isolace a purifikace	Fyzikální zpracování a balení
API z rozdrobněných nebo práškových rostlin	Sběr rostlin nebo kultivace a odebrání	Řezání/rozdrobivování	-	-	Fyzikální zpracování a balení
Rostlinné extrakty používané jako API	Sběr rostlin	Řezání a počáteční extrakce	-	Daší extrakce	Fyzikální zpracování a balení



Janette Bobáfová

Metody kontroly technologických procesů



III. VALIDACE ANALYTICKÝCH PROCEDUR

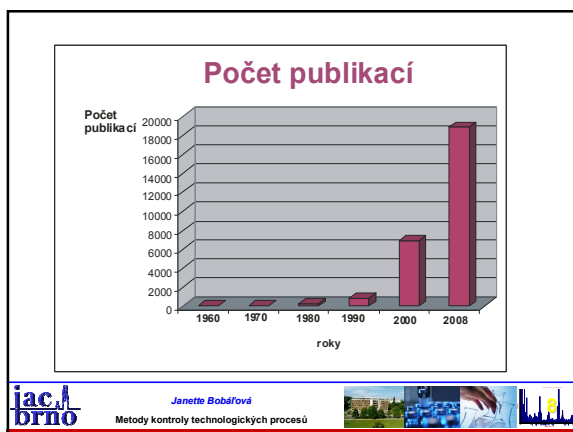
Validace = potvrzení platnosti

- slouží k ověřování vhodnosti, správnosti a spolehlivosti vypracované analytické metody
- proces, při němž se určuje vhodnost použití daného (analytického) systému pro získání relevantních dat
- při validaci posuzujeme, zda jsou parametry metody srovnatelné s požadavky na výsledky
- hledáme vztah mezi požadavky na výsledek a vlastnostmi metody



Janette Bobáfová

Metody kontroly technologických procesů



Janette Bobáfová

Metody kontroly technologických procesů



The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use

- U.S. Food and Drug Administration(FDA)
- European Federation of Pharmaceutical Industries Assoc.(EFPIA)
- Ministry of Health and Welfare, Japan(MHW)
- Japan Pharmaceutical Manufactures Assoc. (JPMA)
- European Commission-European Union (EU)
- Pharmaceutical Research and Manufactures of America(PhRMA)



Janette Bobáfová

Metody kontroly technologických procesů



Úvod:

- validace analytických metod je vyžadována v rámci registrace léčiv
- kromě vlastního postupu metody, je nutné v rámci registrační dokumentace zdůvodnit i volbu metody a její možnosti
- samotná validace musí být doložena výsledky, které prokazují její vhodnost

Předpisy pro validaci analytických procedur vydané v rámci tzv. „Mezinárodní konference pro harmonizaci“:

ICH Q2A: Text on Validation of Analytical Procedures

ICH Q2B: Validation of Analytical Procedures: Methodology



Janette Bobáfová

Metody kontroly technologických procesů



Typy analytických procedur:

- GMP vyžaduje detailní popis každé analytické procedury formou postupných kroků
- Popis zahrnuje:
 1. přípravu reagensií, referenčního standardu, vzorků
 2. použití přístroje (systému)
 3. sestavení kalibrační křivky
 4. použití kalkulačních vztahů



Janette Bobáfová

Metody kontroly technologických procesů



Validace analytických procedur:

- předmětem validace je demonstrace vhodnosti analytického postupu pro zamýšlený účel
- míra vhodnosti je posuzována pomocí definovaných parametrů, mezi které patří především:
 - správnost (accuracy)
 - přesnost (precision)
 - opakovatelnost (repeatability)
 - mezioperační přesnost (intermediate precision)
 - reprodukovatelnost (reproducibility)
 - specifčnost (specificity)
 - detekční limit (detection limit)
 - kvantitativní limit (quantitation limit)
 - linearita (linearity)
 - rozsah (range)
 - robustnost (robustness)



Janette Bobáfová

Metody kontroly technologických procesů



Správnost metody

- Správnost analytické metody představuje míru shody buď konvenčně správné (pravdivé) hodnoty, nebo přijaté referenční hodnoty s hodnotou stanovenou
- Správnost se posuzuje na vzorcích, do kterých jsou přidána známá množství nečistot a má být posuzována s použitím nejméně 9 stanovení v rozmezí nejméně 3 koncentračních hladin, které pokrývají specifikovaný rozsah (např. 3 koncentrace/3 opakování)
- O správnosti se podává zpráva v procentech získaných stanovením obsahu známého přidaného množství analyzované látky ke vzorku, nebo jako rozdíl mezi střední hodnotou a skutečnou (referenční) hodnotou s uvedením intervalů spolehlivosti



Janette Bobáfová

Metody kontroly technologických procesů



Metodický postup:

Správnost analytické metody indikuje systematickou chybu a lze ji posoudit některým z uvedených postupů:

a) Při porovnání výsledků s výsledky jiné nezávislé metody se statisticky porovnávají dva soubory nezávislých výsledků (získaných testováním stejného homogenního vzorku) na shodnost (T-test) a variaci (F-test). Analytická metoda se považuje správnou, pokud na hladině významnosti $\alpha=0,05$ není rozdíl mezi oběma soubory statisticky významný.

b) Při metodě standardního přídatku se porovnávají získané výsledky s výsledky získanými metodou přímého stanovení. Hodnocení správnosti je stejné jako při porovnávání výsledků s nezávislou metodou.

c) Testování modelového vzorku, který byl připraven z placeba a známého přidaného množství standardu, které je považováno za skutečnou hodnotu. Statisticky se vyhodnocuje průměrná hodnota tzv. výtěžnosti (recovery).

$$\text{Recovery} = 100 \times \frac{\text{nalezená hodnota}}{\text{skutečná hodnota}}$$



Janette Bobáfová

Metody kontroly technologických procesů



Přesnost

- Představuje míru shody mezi sérií výsledků získaných mnohonásobnou analýzou vzorku za předepsaných podmínek

Metodický postup:

Přesnost lze vyhodnocovat ve třech úrovních:

a) **Opakovatelnost** je přesnost výsledků analýz provedených za stejných podmínek v krátkém časovém intervalu (posouzena v téže laboratoři, stejným analytikem, na stejném přístroji, ve stejný den a s použitím stejných chemikálií a roztoků).

Pro posouzení se používá:

1. minimálně 9 stanovení, pokrývajících specifikovaný rozsah analytické procedury (např. 3 koncentrace/3 opakování)
2. minimálně 6 stanovení při 100 % koncentraci daného testu
Statisticky je vyjadřována – směrodatná odchylka, relativní standardní odchylka a interval spolehlivosti průměrné hodnoty

b) **Mezioperační či laboratorní přesnost** vyjadřuje variabilitu v rámci laboratoře (různé přístroje, analytici, dny, chemikálie apod.)

c) **Reprodukovatelnost** je přesnost mezi laboratořemi - komparativní studie mezi laboratořemi určené ke standardizaci metodologie



Janette Bobáfová

Metody kontroly technologických procesů



Specifčnost metody

- Specifčnost analytické procedury představuje její schopnost ocenit jednoznačně analyzovanou látku v přítomnosti očekávaných komponent (nečistot, doprovodných látek apod.)
- Selektivita metody se mění v závislosti na koncentraci stanovovaného analytu, v závislosti na koncentraci ostatních komponent matrice
- Použitelnost metody by měla být studována pomocí různých vzorků od čistých etalonů po směsi s komplexními maticemi

Metodický postup:

a) Analyzujeme n-krát ($n > 10$) vzorek čistého analytu - střední hodnota

b) Analyzujeme n-krát vzorek čistého analytu s přídatkem příměsí v takových koncentracích, které jsou přibližně stejné jako v reálné matici - střední hodnota

c) Testování shody středních hodnot. Pokud je zamítnuta hypotéza o shodě, vypočteme korekční faktor.



Janette Bobáfová

Metody kontroly technologických procesů



Detekční limit (DL)

-Představuje nejnižší množství látky ve vzorku, které může být detekováno, ale které není nutně kvantifikovatelné jako exaktní hodnota

-Limit je nutný pro limitní testy, kdy je dokazováno, že množství analyzované látky je nad nebo pod detekční limit

Metodický postup:

a) Vizualní hodnocení (neinstrumentální metody)

b) Na základě poměru signálu k šumu základní linie (provádí se porovnáním naměřených signálů ze vzorků se známými nízkými koncentracemi analyzované látky se signály ze slepých vzorků a stanovením nejmenší detekovatelné koncentrace. Přijatelný poměr signálu k šumu základní linie - 3:1 nebo 2:1

c) Na základě směrodatné odchylky odezvy a směrnice

$$DL = \frac{3,3\sigma}{S}$$

kde σ = směrodatná odchylka odezvy
S = směrnice kalibrační křivky



Janette Bobáfová

Metody kontroly technologických procesů



Kvantitativní limit (QL)

- Představuje nejnižší množství látky ve vzorku, kterou lze stanovit jako exaktní hodnotu se stanovenou přesností a správností

Metodický postup:

- Vizuální hodnocení (neinstrumentální metody)
- Na základě poměru signálu k šumu základní linie (provádí se porovnáním naměřených signálů ze vzorků se známými nízkými koncentracemi analyzované látky se signály ze slepých vzorků a ustavením minimální koncentrace, při níž může být analyzovaná látka spolehlivě kvantifikována. Typický poměr signálů je 10:1)
- Na základě směrodatné odchylky odezvy a směrnice

$$QL = \frac{10\sigma}{S}$$

kde σ = směrodatná odchylka odezvy
S = směrnice kalibrační křivky



Janette Bobáfová

Metody kontroly technologických procesů



Linearita

- Schopnost metody dávat výsledky přímo úměrné koncentraci stanovené látky ve vzorku

- Zjištění lineární části kalibrační závislosti se provádí s využitím regresní diagnostiky

- Po vyhodnocení získáme přímkový regresní model $Y_{reg} = b_0 + b_1x$

Metodický postup:

- Proměření kalibrace dle experimentálního plánu
- Testování homogenity rozptylů
- V části kalibrační křivky, kde je prokázána shoda rozptylů se testuje linearita nejčastěji některým z F testů



Janette Bobáfová

Metody kontroly technologických procesů



Rozsah

- Rozsah analytické procedury představuje interval mezi horní a spodní koncentrací analyzované látky ve vzorku, pro kterou bylo demonstrováno, že analytická procedura má odpovídající přesnost, správnost a linearitu
- Pro stanovení obsahu léčivé látky obvyklý rozsah je 80 - 120 % testované koncentrace

Metodický postup (pro pracovní rozsah):

- Změříme závislost analytického signálu na koncentraci v nejširším možném intervalu koncentrací včetně slepého pokusu.
- Zobrazíme závislost vhodným statistickým programem.
- Na základě subjektivní úvahy zvolíme předpokládanou lineární oblast.
- V této oblasti znovu experimentálně metodu kalibrujeme, přičemž uvažujeme vliv matrice a kalibrujeme při optimální kombinaci významných faktorů.



Janette Bobáfová

Metody kontroly technologických procesů



Robustnost

- Kritické parametry měření a jejich tolerance musí být známy pro každý analytický postup (např.: pH, teplota, čistota a stáří činidel, vlhkost)
- V testu se zkoušejí pozmeněné objemy, časy, navážky, vlivy různých šarží činidel apod.
- Cílem je prokázat spolehlivost analytické procedury vzhledem na úmyslné variability parametrů metody

V případě kapalinové chromatografie bývají typickými příklady variabilit:

- vliv pH v mobilní fáze
- vliv složení mobilní fáze
- různé kolony (různé šarže nebo dodavatelé)
- teplota
- průtoková rychlost



Janette Bobáfová

Metody kontroly technologických procesů



SHRNUTÍ

Jak dosáhnout kvalitních produktů?

- Abychom získali smysluplné výsledky je nezbytná validace metod.
- Validaci je třeba plánovat a provádět v souladu s analytickými požadavky.
- Vhodné způsoby validování závisí na aplikační oblasti.
- Pracovníci by měli rozumět jednotlivým validačním parametrům.



Janette Bobáfová

Metody kontroly technologických procesů



PŘÍKLAD HPLC

- Předmětem validace analytických procedur je demonstrace vhodnosti analytického postupu pro zamýšlený účel
- Vlastní provedení validace analytické procedury představuje pečlivé naplánování analýz vhodných vzorků, získání odpovídajících analytických dat a jejich zpracování ve shodě s požadavky pro jednotlivé charakteristiky

Validační protokol

- schvalovací list
- validační tým
- popis analytické procedury
- experimentální podmínky
- způsoby hodnocení validačních charakteristik a kritéria přijatelnosti
- harmonogram
- formuláře

Schvalovací list - uvedení a podepsání autoři, posuzovatelé a schvalovatelé plánu validační studie

Validační tým - zahrnuje osoby, které se zúčastní validační studie včetně jejich funkce ve validačním týmu



Janette Bobáfová

Metody kontroly technologických procesů



Popis analytické procedury - nutné uvést

- princip metody
- požadované materiály
 - specifikace standardů, chemikálií, rozpouštědel
 - způsob přípravy mobilní fáze
 - způsob přípravy roztoků standardů a vzorků
- popis a způsob použití HPLC systému, zařízení a vybavení
 - kondicionace systému
 - posouzení způsobilosti systému
 - kalibrace a rekalibrace systému
 - způsob provádění analýz a získávání dat
- zpracování a vyhodnocení dat



Janette Bobáfová

Metody kontroly technologických procesů



Experimentální podmínky - nutné uvést

- všechny předpokládané podmínky pro provedení dané validační studie
- HPLC systémy
 - specifikace (autosamplery, pumpy, kolony, termostaty, detektory, řídicí systém)
 - informace o kvalifikaci-IQ, OQ, PQ
- ostatní přístroje a měřidla (váhy, termostat, lednice, ultrazvuková lázeň, vakuová pumpa)
 - specifikace
 - informace o kalibraci resp. kvalifikaci
- laboratorní sklo
 - specifikace resp. certifikáty
- materiály (standarty, vzorky, chemikálie, rozpouštědla, pomocné materiály)
 - specifikace resp. certifikáty
 - podmínky skladování a doba použitelnosti



Janette Bobáfová

Metody kontroly technologických procesů



Způsoby hodnocení validačních charakteristik a kritéria přijatelnosti

SPECIFIČNOST - schopnost procedury ocenit jednoznačně analyt v přítomnosti očekávaných komponent
- rozlišit analyt
- stanovit analyt s přidávanými komponentami

Podmínky testování

Systém: HPLC

Rozsah:

- SST - test způsobilosti systému
- IDENT - test identity analytu
- CAL - kalibrace a ověřování
- INDEP - test nezávislosti výsledků
- REPLIC - test přesnosti výsledků

SST - test způsobilosti systému

- provedení

HPLC systém se nechá kondicionovat

Připraví se roztok standardů analytu v mobilní fázi

Provede se 6 analýz roztoku

Vypočte se RSD ploch píků

- kritérium přijatelnosti

RSD < 0,71 %



Janette Bobáfová

Metody kontroly technologických procesů



IDENT - test identity analytu

- provedení

Připraví se roztoky:

mobilní fáze

placebo

placebo a analyt

placebo a analyt a rozkladné produkty

vzorek produktu

vzorky po zátěži

- kyselá hydrolyza, 80 °C, 24 hod

- alkalická hydrolyza, 80 °C, 24 hod

- oxidace, 3 % H₂O₂, 80 °C, 4 hod

- fotolýza, 30 – 60 °C, 4 hod

Zhotoví se reprezentativní chromatogramy, identifikují se komponenty a provede se vizuální

inspekce všech píků

Pro pík analytu se vypočítají počet teoretických pater, kapacitní faktor, faktor symetrie, rozlišení

píků

- kritérium přijatelnosti

Žádné opožděné píky

Prokázání shodnosti UV spekter

Pro všechny individuální hodnoty pík analytu:

- faktor symetrie < 0,8

- rozlišení > 1,5



Janette Bobáfová

Metody kontroly technologických procesů



CAL - kalibrace a ověřování

- provedení

Připraví se roztoky standardů analytu o koncentraci 50, 80, 100, 120 a 150 % v mobilní fázi

Sestrojí se kalibrační křivka

- kritérium přijatelnosti

Korelační koeficient kalibrační křivky > 0,999

INDEP - test nezávislosti výsledků

- provedení

Připraví se 6 dvojic roztoků:

placebo a analyt

placebo a analyt a rozkladné produkty

Všechny roztoky se analyzují dle náhodného schématu

Výsledky pro dvojice odpovídajících roztoků se porovnávají statistickým testem na párovou shodnost

- kritérium přijatelnosti

Test párové shody má vyloučit vliv rozkladných produktů na stanovení analytu ve vzorku

REPLIC - test přesnosti výsledků

- provedení

Připraví se 6 roztoků vzorku produktu

Výsledky se statisticky zpracují

- kritérium přijatelnosti

RSD < 1,67 %



Janette Bobáfová

Metody kontroly technologických procesů



LINEARITA – schopnost vyjádřit proporcionální vztah mezi nalezenými výsledky a koncentrací analytu ve vzorku

- provádí se pro minimálně 5 koncentračních úrovní

- požadovaná data: parametry regresní přímky, korelační koeficient, grafické

znázornění závislosti

SPRÁVNOST – míra shody pravdivé hodnoty, nebo přijaté referenční hodnoty s hodnotou stanovenou

PŘESNOST – míra shody výsledků homogenního vzorku získanými jeho mnohonásobnou analýzou

RANGE – představuje interval mezi horní a dolní koncentrací analytu ve vzorku

Podmínky testování

Systém: HPLC

Rozsah: LIN – test linearity výsledků

ACPR – test správnosti a pečlivosti výsledků

ROBUSTNOST – míra odolnosti procedury k malým, ale záměrným variacím parametrů metody

TEST ZPŮSOBILOSTI SYSTÉMU – zařízení, procedura a vzorky tvoří integrální systém

Podmínky testování

Systém: HPLC

Rozsah: STAB – test stability výsledků

ROBUST – test robustnosti (Flackett-Burmanův návrh experimentu)



Janette Bobáfová

Metody kontroly technologických procesů



Harmonogram

- testovací plán
- podmínky testování
- dobu testování
- odpovědnou osobou

Formuláře

- celkový kontrolní list
- formuláře pro individuální testy

Validační zpráva

- záznamy z testování
- tabulky a diagramy
- kalibrační certifikáty

Monitorování analytické procedury

- kalibrační faktor
- rozlišení mezi významnými píky
- faktor symetrie píku analytu
- počet teoretických pater
- opakovatelnost nástřiku



Janette Bobáfová

Metody kontroly technologických procesů



Analytica Chimica Acta 647 (2009) 226–230

Contents lists available at ScienceDirect



Analytica Chimica Acta

Journal homepage: www.elsevier.com/locate/aca



Development of high performance liquid chromatography method for buspirone in rabbit serum: Application to pharmacokinetic study

Ramesh Ganju, Shrawan Kumar Yamsani, Chinnu Reddy Palem, Vamsi Vishnu Yamsani, Harshini Kotagiri, Madhusudan Rao Yamsani*

Center for Biopharmaceutics and Pharmacokinetics, University College of Pharmaceutical Sciences, Kakajura University, Warangal 506006, Andhra Pradesh, India

ARTICLE INFO

Article history:
Received 27 February 2009
Received in revised form 2 May 2009
Accepted 1 June 2009
Available online 7 June 2009

Keywords:
Buspirone
Reservoir based high performance liquid chromatography
Pharmacokinetics

ABSTRACT

A simple and sensitive high performance liquid chromatographic (HPLC) method for quantification of buspirone (BUSP) in rabbit serum was developed and validated. BUSP and internal standard (IS), dibutyltin hydrochloride were extracted into dichloromethane and separated using an isocratic mobile phase, as a reversed phase column. Thereafter was monitored by UV detector at 255 nm and a flow rate of 1.0 mL min⁻¹. The linearity range of proposed method was 1–5000 ng mL⁻¹. The intra-day and inter-day coefficient of variation and percent error values of the assay method were less than 10% and assay recovery was more than 97% and 98% for BUSP and IS, respectively. The method was found to be precise, accurate, and specific during the study. The method was successfully applied for pharmacokinetic study of buspirone after application of reservoir based transdermal therapeutic system of BUSP in rabbits.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.



Janette Bobáfová

Metody kontroly technologických procesů

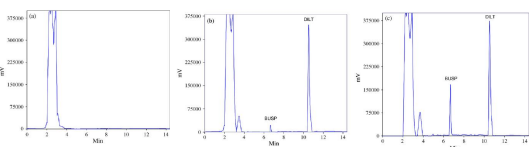


Fig. 2. HPLC chromatograms of (A) blank rabbit serum (B) serum spiked with 1 ng of BUSP and 150 ng of DILT and (C) rabbit serum collected at 48 h, after application of BUSP reservoir based transdermal therapeutic system, corresponding concentration of BUSP was 10.20 ng mL⁻¹. The retention times of BUSP and DILT were 6.67 and 10.53 min, respectively.

Analytica Chimica Acta 647 (2009) 226–230



Janette Bobáfová

Metody kontroly technologických procesů



Table 4
The robustness data of the developed HPLC method.

Parameter	Modification	Retention time (min)		Tailing factor		Plates		Resolution
		BUSP	DILT	BUSP	DILT	BUSP	DILT	
Mobile phase ratio (v/v) acetonitrile: buffer (pH 4.6)	33:67	6.94	11.10	1.36	1.33	6683	15541	6.40
	35:65	6.65	10.48	0.90	0.96	6136	13854	8.21
	37:63	6.32	10.12	1.00	0.90	5542	12018	8.94
Flow rate (mL min ⁻¹)	0.8	8.26	12.84	1.32	1.12	9467	20796	7.63
	1.0	6.63	10.42	0.92	1.00	6909	13895	8.42
	1.2	5.68	8.78	0.89	0.92	4476	9724	7.75
Buffer concentration (mM)	5	6.67	10.52	1.30	1.26	6173	13980	7.00
	10	6.64	10.45	0.94	0.90	6317	12774	8.47
	15	6.70	10.61	0.92	1.02	6228	14099	8.69
Temperature (°C)	25	6.74	10.82	1.36	1.04	6303	14767	6.80
	30	6.68	10.62	1.00	0.90	5301	14236	8.76
	35	6.32	9.84	0.92	0.96	5542	12213	7.82
pH	4.4	6.52	10.22	1.02	0.88	5898	13175	8.22
	4.6	6.60	10.40	1.00	0.92	6044	12643	8.44
	4.8	6.64	10.50	1.12	1.04	6117	13907	5.94

Analytica Chimica Acta 647 (2009) 226–230



Janette Bobáfová

Metody kontroly technologických procesů



IV. KVALIFIKACE PŘÍSTROJŮ

Postup při validaci analytických přístrojů a zařízení, používaných v laboratořích.

Základní stupně validace:

1. Kvalifikace projektu (Design Qualification, DQ)
2. Instalační kvalifikace (Installation Qualification, IQ)
3. Operační kvalifikace (Operational Qualification, OQ)
4. Procesní kvalifikace (Process/Performance Qualification, PQ)



Janette Bobáfová

Metody kontroly technologických procesů



1. **DQ** = popisuje a ověřuje návrh požadavků a specifikace přístroje a dává detailní podklady pro významná rozhodnutí při volbě dodavatele.

Hlavním smyslem DQ je potvrdit, že:

- a) pro specifické úkoly byl vybrán správný druh zařízení,
- b) zařízení odpovídá předpokládanému použití,
- c) dodavatel vyhovuje kvalifikačním kritériím uživatele.

2. **IQ** = prokazuje, že přístroj byl dodán podle projektu a jak bylo specifikováno

Hlavním účelem IQ je ujistit se, že:

- a) zařízení bylo dodáno podle objednávky,
- b) součásti dodávky je příslušná dokumentace
- c) zvolené okolní prostředí vyhovuje specifikacím,
- d) jednotlivé moduly a veškerá příslušenství jsou správně nainstalována a vzájemně přepojeny,
- e) SW je kompletně instalován
- f) přístroj ve zvoleném prostředí funguje (základní testy-test ROM, RAM, displeje, dálkových propojení).

3. **OQ** = proces, kterým se prokazuje, že přístroj bude fungovat ve zvoleném prostředí podle svých operačních specifikací.



Janette Bobáfová

Metody kontroly technologických procesů



Příklad testů pro HPLC

Správnost průtokové rychlosti

Postup testu: Změří se průtoková rychlost odměrnou baňkou a stopkami nebo kalibrovaným digitálním průtokoměrem.

Limity přijatelnosti: $\pm 5\%$ od deklarované hodnoty

Frekvence testu: Ročně

Přesnost průtokové rychlosti

Postup testu: 5 nástržků standardu, z retenčních časů se vypočte relativní směrodatná odchylka (RSD).

Limity přijatelnosti: RSD $< 2\%$

Frekvence testu: Ročně (doporučený standard kofein)

Přesnost ploch pík

Postup testu: 5 nástržků standardu, z ploch pík se vypočte relativní směrodatná odchylka (RSD).

Limity přijatelnosti: RSD $< 2\%$

Frekvence testu: Ročně (doporučený standard kofein)

Správnost teploty termostatu pro kolony

Postup testu: Změří se teplota v termostatu pro kolony a porovná se s nastavenou hodnotou.

Limity přijatelnosti: $\pm 1\text{ }^\circ\text{C}$ od deklarované hodnoty

Frekvence testu: Ročně

Přesnost teploty termostatu pro kolony

Postup testu: Po dobu 20 minut se měří teplota kolony při $40\text{ }^\circ\text{C}$.

Limity přijatelnosti: $\pm 0,5\%$ od ustálené hodnoty

Frekvence testu: Ročně



Janette Bobáfová

Metody kontroly technologických procesů



Šum základní linie

Postup testu: Po dobu 20 minut se zaznamenává základní linie. Měří se šum pik-pik v sekcích po 1 min. Výsledky se zprůměrují.

Limity přijatelnosti: $\leq 1 \times 10^{-4}$ AU

Frekvence testu: Ročně

Linearita detektoru

Postup testu: Nastříkne se 5 standardů kofeinu o různé koncentraci. Měří se závislost odezvy proti množství. Vypočte se odchylka nebo korelační koeficient (ρ).

Limity přijatelnosti: odchylka $\leq 5\%$ nebo $\rho \geq 0,999$ pro odezvu $\leq 1,5$ AU

Frekvence testu: Ročně

Správnost vlnové délky UV/VIS detektoru

Postup testu: Skenuje se látka se známým spektrem. U absorpčních maxim se odečte vlnová délka a porovná s deklarovanou.

Limity přijatelnosti: ± 2 nm deklarované hodnoty (pro každé maximum)

Frekvence testu: Vždy po 3 měsících a kdykoliv se detektorem pohne.

Přesnost automatickým injektorem (autosamplerem)

Postup testu: Nastříkne se standard, poté slepý vzorek (blank) a změní se poměr ploch pík blanku a standardu.

Limity přijatelnosti: $\leq 0,3\%$

Frekvence testu: Ročně

Správnost míchání mobilní fáze

Postup testu: Nastaví se míchání fází na 10, 11, 50 a 90 % mobilní fáze s acetonem a úroveň odezvy se vztáhne na 100 %.

Limity přijatelnosti: $\pm 2\%$

Frekvence testu: Ročně



Janette Bobáfová

Metody kontroly technologických procesů



4. PQ = proces, kterým se dokazuje, že přístroj soustavně pracuje podle specifikací, které jsou přiměřené pro jeho rutinní používání

PQ má zahrnovat:

- definice kritérií procesního chodu a testovacích postupů,
- výběr kritických parametrů např. pro chromatografický systém:
 - šum základní linie,
 - přesnost nástržku,
 - přesnost retenčních časů,
 - rozišení,
 - šířka píku v polovině výšky,
 - faktor chvostování.
- kritéria přijatelnosti,
- definice opravných akcí



Janette Bobáfová

Metody kontroly technologických procesů



V. KALIBRACE A ÚDRŽBA LABORATORNÍCH PŘÍSTROJŮ

Program kalibrace a údržby laboratorních přístrojů a měřidel - součástí správné praxe

Výsledky mimo limit - OOS „out of specification“

C.L. Nielsen „Managing the Analytical Laboratory – Plain and Simple“ (1996)

Pro vytvoření a provozování efektivního programu musí být zváženy následující aspekty:

- úplná přístrojová dokumentace
- standardní operační předpis pro provádění kalibrace, údržby a servisu pro každý přístroj



Janette Bobáfová

Metody kontroly technologických procesů



Intervaly laboratorní kalibrace/údržby

- analytické váhy	1 den
- předvážky	1 měsíc
- pH metry	při použití
- HPLC	3 měsíce
- GC	6 měsíců
- UV	6 měsíců
- Teploměry	1 rok
- Sušárny	1 rok
- Chladničky	1 rok

Dokumentace a registr přístrojů a příslušenství

- provozní deník
 - datum kalibrace
 - jméno pracovníka
 - datum kalibrační expirace



Janette Bobáfová

Metody kontroly technologických procesů



SHRNUTÍ

- Program kalibrace a údržby laboratorních přístrojů je nedílnou součástí správné výrobní praxe.

- Základní význam tohoto systému: „Poskytovat spolehlivé výsledky“.



Janette Bobáfová

Metody kontroly technologických procesů



VI. PŘENOS ANALYTICKÝCH METOD

Významný problém při vývoji léčiv je přenos analytických metod mezi laboratořemi.

- organizace ISPE (International Society for Pharmaceutical engineering) vydala pokyn „*Technology transfer*“

- typy lékových forem:
 - pevné
 - parenterální
 - inhalační
 - polotuhé, masti, krémy
 - tekuté, suspenze
 - transdermální
 - oční



Janette Bobáfová

Metody kontroly technologických procesů



- seznam typických metod pro testování lékových forem, které mají být přenášeny:

- stanovení obsahu
- uniformita obsahu
- nečistoty, rozkladné produkty, zbytková rozpouštědla
- disoluce/rychlost uvolňování
- testy totožnosti
- verifikace čištění
- mikrobiologické testování
- sterilita
- podávaná dávka
- fyzikální kritéria



Janette Bobáfová

Metody kontroly technologických procesů



ZÁVĚR

Jak vybrat z mnoha metod nejlepší postup?

1. Identifikovat problém – požadovaná informace (typ analýza, ...).
2. Nalézt faktory, které je nutné posuzovat (kritéria: jaká přesnost, správnost, linearita...).
3. Identifikace interferencí.
4. Volba metody (vyhledání vhodných metod v literatuře, normách, modifikace existujících metod).
5. Provedení validace metody.
6. Provedení validace analytických přístrojů a zařízení, používaných v laboratořích.



Janette Bobáfová

Metody kontroly technologických procesů



Literatura

1. Green, J. M.: A Practical Guide to Analytical Method Validation. Analytical Chemistry 1996, 68, 305A-309A.
2. Vessman, J. et al.: Selectivity in analytical chemistry. Pure Appl. Chem., 2001, 73, 1381–1386.
3. Figer, P.; Koruna, I: Správná laboratorní praxe – historie, zavádění, legislativa a zásady SLP. CHEMagazín 2005, 5, ročník XV.
4. Barek, J. et al.: Metrologická terminologie v chemii. Chem. Listy, 2000, 94, 439–444.
5. ČSN EN ISO 9000:2001. Systémy managementu jakosti. Základy, zásady, slovník.
6. ČSN 01 0251. Stanovení opakovatelnosti a reprodukovatelnosti normalizované zkušební metody pomocí mezilaboratorních zkoušek.



Janette Bobáfová

Metody kontroly technologických procesů

