

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

**FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**

**KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE**

**PLATNÉ NORMY UPRAVUJÍCÍ VALIDACE HPLC METOD**

**( PŘEHLED, SROVNÁNÍ )**

**(REŠERŽNÍ PRÁCE)**

***BAKALÁŘSKÁ PRÁCE***

**HRADEC KRÁLOVÉ 2006**

**JITKA POLÁČKOVÁ**

Děkuji PharmDr.Ludmile Matysové za její odborné vedení,rady,pomoc při vypracování této bakalářské práce.

## **Obsah**

1	Úvod .....	<a href="#">63</a>
2	Cíl práce .....	<a href="#">83</a>
3	Validace .....	<a href="#">103</a>
4	Druhy validací .....	<a href="#">123</a>
4.1	Vnitřní validace .....	<a href="#">123</a>
5.	Validační program .....	<a href="#">133</a>
5.1	Pracovní postup .....	<a href="#">133</a>
5.2	Validační parametry .....	<a href="#">143</a>
5.2.1	Přesnost .....	<a href="#">153</a>
5.2.1.1	Opakovatelnost.....	<a href="#">153</a>
5.2.1.2	Reprodukovatelnost.....	<a href="#">153</a>
5.2.1.3	Mezilehlá přesnost.....	<a href="#">163</a>
5.2.2.	Správnost .....	<a href="#">163</a>
5.2.2.1	Výtěžnost.....	<a href="#">173</a>
5.2.2.2	Nesprávnost .....	<a href="#">173</a>
5.2.3	Linearita.....	<a href="#">183</a>
5.2.4	Rozsah.....	<a href="#">193</a>
5.2.5	Selektivita .....	<a href="#">193</a>
5.2.6	Robustnost.....	<a href="#">203</a>
5.2.7	Detekční limit .....	<a href="#">213</a>
5.2.8	Kvantitativní limit .....	<a href="#">223</a>

5.2.9	Test způsobilosti .....	<a href="#">223</a>
5.2.10	Směrodatná odchylka ( $s_x$ ) .....	<a href="#">233</a>
5.3.	Revalidace .....	<a href="#">233</a>
5.4	Validační protokol.....	<a href="#">243</a>
5.5	Literatura .....	<a href="#">243</a>
6	Závěr .....	<a href="#">263</a>
7	Literatura.....	<a href="#">293</a>

# 1 Úvod

Validace je proces, kterým se zjišťují nejdůležitější charakteristiky metody. Smyslem validace je demonstrovat, že vypracovaná metoda je pro daný účel vhodná. Cílem validace je určit podmínky, za kterých je zkušební postup použitelný a zjistit stejnou spolehlivost při opakovaném použití v jedné nebo i v různých laboratořích [6].

## **2 Cíl práce**



Cílem této bakalářské práce je zabývat se problematikou validace.

Řekneme si:

- co pojem validace znamená
- druhy validací
- za jakým účelem se provádí
- kdo ji provádí
- za jakých podmínek
- co je nutné k validaci
- problémy validace
- postup validace
- jednotlivé parametry

### **3 Validace**

Validace je procedura, jejímž cílem je demonstrovat a dokumentovat kvalitu analytické metody ustanovením definovaných kritérií a měřením hodnot těchto kritérií. Zjednodušeně můžeme tedy říci, že validace je ověření platnosti zvolené analytické metody či postupu.

Validace se používá vždy při validaci nové metody, při pořízení a před aplikací nového analytického měřicího systému do laboratoře, při zavedení nového (jiného) diagnostického kitu, pokud rozšíříme použití stávající metody o další účel (například rozšíříme měření o další druh biologického materiálu), při převodu validované metody (např. z vývojové do přijímací laboratoře, publikované validované metody), při kontrole způsobilosti systému, při revadilaci metody, kdy podmínky revadilace jsou striktně stanoveny, ukazuje-li kontrola kvality přetrvávající problém. [1 ], [2 ]

Validaci provádějí výrobci diagnostik, kteří musí uvádět na trh Evropské unie pouze validované měřicí systémy, dále laboratoře, profesionální organizace analytiků atd. [2]

Validací se zabývají instituce jako je **STÁTNÍ ÚSTAV PRO KONTROLU LÉČIV** (zabývá se normami validace metod od roku 1992), **ICH** (INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE), **ČESKÝ LÉKOPIS 2005** (ten však validace příliš mnoho nepopisuje), **USP** (lékopis Spojených států).

Trendem moderního analytického měření je používat validované kity a měřicí systémy a přenést hlavní pozornost laboratoří na odhady nejistot měření, kontrolu kvality, edukaci, soustavné sledování informací, implementaci nových poznatků do praxe laboratorní činnosti. [2]

S validací také souvisí některé problémy jako je např. definice analytu, vzorkování, transport a účel měření, souhrn minimálních požadavků na kvalitu měřicího přístroje, návaznost měřících standardů a mnoho dalších. [2]

## 4 Druhy validací <sup>1</sup>

- **vnitřní (interní) validace**

validace metody v rámci jedné laboratoře

- **Vnější (externí) validace**

zahrnuje interní validaci společně s validací metody srovnáním výsledků metody z více laboratoří a zahrnuje výpočet reprodukovatelnosti metody

### 4.1 Vnitřní validace

- **průzkumová validace**

Cílem je na omezeném počtu vzorků stanovit, zda zvolená analytická metoda je vhodnou metodou pro validaci. Zaměřuje se na vyhodnocení parametrů jako je selektivita, robustnost, dále na stanovení opakovatelnosti na omezeném počtu vzorků.

- **plná validace**

Cílem je demonstrovat vhodnost metody na základě vyhodnocení všech požadovaných validačních parametrů.

- **validace při převodu metody**

Zahrnuje stanovení správnosti laboratoře a opakovatelnosti.

- **retrospektivní validace**

Používá se tehdy, jestliže již existují dříve naměřená data, která byla naměřena za stejných podmínek. K ověření platnosti dříve plně zvalidované metody se používá kontrola způsobilosti metody a zahrnuje pouze kontrolu kalibrační přímky (linearita a citlivost).

Umožňuje vyhodnotit jeden z nezákladnějších parametrů – opakovatelnost.

---

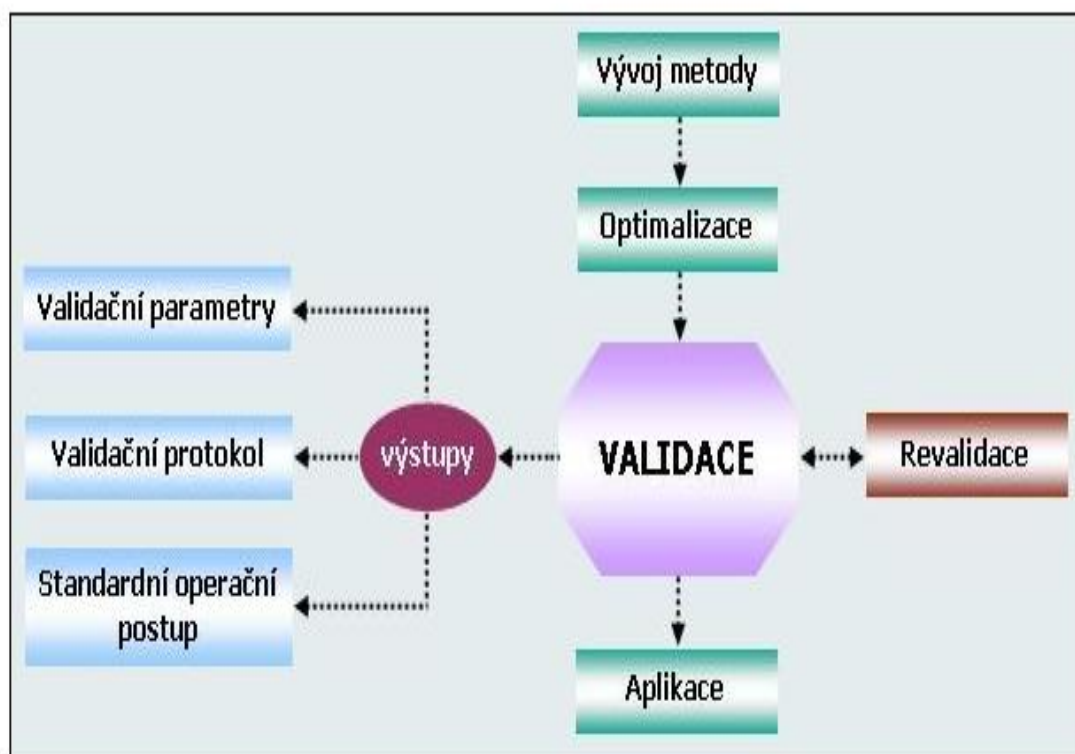
<sup>1</sup> bylo čerpáno z [1]

## 5. Validační program <sup>2</sup>

**Validační program musí obsahovat nejméně tyto údaje:**

- pracovní postup
- validační parametry
- podmínky revalidace systému
- validační protokol
- literatura (kritická rešerže, konzultace)

Schéma: <sup>3</sup>



### 5.1 Pracovní postup <sup>4</sup>

<sup>2</sup> bylo čerpáno z [1]

<sup>3</sup> bylo čerpáno z [3]

<sup>4</sup> bylo čerpáno z [1]

Pracovní postup slouží k reprodukování celé analytické metody (vybrané). Musí obsahovat veškeré důležité instrukce, musí být přesný, podrobný, úplný. Musí být také dostatečně optimalizován.

Pracovní postup musí zahrnovat tyto údaje:

- stručná charakteristika

Použití metody, její princip, chemické reakce stanovované složky, princip měření, jednotky, analyt a matrice, rozmezí obsahů stanovované složky.

- roztoky, činidla, pomocné chemikálie

Chemická čistota použitých chemikálií, jejich úprava a čištění, příprava rozpouštědel, činidel a pomocných chemikálií, stabilita a koncentrace.

- standardní operační procedura

Mechanická úprava vzorku, chemická úprava vzorku, kalibrace, měření, výpočty a hodnocení.

## **5.2      *Validační parametry***

Obecně analytické parametry, ověřované při validaci jsou:

- přesnost
- správnost
- linearita, rozsah
- selektivita
- robustnost
- detekční limit
- kvantitativní limit
- test způsobilosti

## 5.2.1 Přesnost

Přesnost je míra shody mezi jednotlivými výsledky metody opakovaně prováděné s homogenním vzorkem. [5]

*Podle podmínek opakování metody rozlišujeme :*

- opakovatelnost
- reprodukovatelnost
- mezilehlá (intermediární) přesnost

### 5.2.1.1 Opakovatelnost

Při stanovení opakovatelnosti se metoda provádí jedním analytikem na téže přístroji, se stejnými činidly, na jednom zhomogenizovaném vzorku. Jde tedy o přesnost uvnitř laboratoře. [5]

Přesnost se vyjádří jako směrodatná odchylka a stanoví se minimálně ze 6 nezávislých analýz zhomogenizovaného vzorku, provedených kompletním postupem, počínaje přípravou vzorku. Musíme si uvědomit, že jde o chybu celého analytického postupu, takže nestačí např. 6x nastříknout do chromatografu jeden roztok, ale musí se kompletním postupem připravit 6 roztoků vzorku. [5]

Státní ústav pro kontrolu léčiv požaduje jen doložení opakovatelnosti metody, tedy přesnost metody při provedení jedním analytikem, na jednom přístroji, se stejnými činidly. [5]

### 5.2.1.2 Reprodukovatelnost

Při stanovení reprodukovatelnosti se metoda provádí na jednom zhomogenizovaném vzorku, ale v různých laboratořích, různými analytiky, s různými činidly a nakonec i s různými přístroji. Takže v tomto případě hovoříme o přesnosti při přenosu metody u jedné laboratoře do druhé. [5]

### 5.2.1.3 Mezilehlá přesnost

Metoda se provádí s různými činidly, analytiky i přístroji, v různý den, ale v jedné laboratoři a se stejným zhomogenizovaným vzorkem. [6]

### 5.2.2. Správnost

Vyjadřuje shodu mezi získaným výsledkem a správnou hodnotou. Zjistit správnou hodnotu může být ale problém. [4], [5]

Správnou hodnotu lze zjistit:

- jinou nezávislou metodou s ověřenou správností
- modelovým vzorkem, tj. placebo s přidaným standardem
- analýzou vzorku s přidáním standardní látky

Pokud se analyzuje modelový vzorek, přidává se standardní látka v množství menším i větším, než je deklarovaný obsah. Některé postupy uvádějí 10%, jiné 50%. [5]

SÚKL požaduje jen jednu hladinu, tedy stanovení minimálně 6ti různých modelových vzorků s přibližně 100% obsahem stanovované látky. Při přidání standardní látky se ke vzorku přidává méně než 100%, aby se výsledek nedostal mimo kalibrační křivku. [5]

Správnost se vyjadřuje jako rozdíl hodnot nebo jako výtěžnost : [6]

$$V = \frac{100 * NH}{SH}$$

V.....výtěžnost

NH.....nalezená hodnota

SH.....správná hodnota



### 5.2.2.1 Výtěžnost

Výtěžností se rozumí procentuální podíl skutečné koncentrace látky, který bylo možné postihnout během analytického postupu. Není-li k dispozici certifikovaný referenční materiál, stanoví se výtěžnost při validaci. [4]

### 5.2.2.2 Nesprávnost<sup>5</sup>

Nesprávnost metody je způsobena systematickou chybou, odchyluje výsledek vždy jedním směrem. Systematická chyba může mít složku konstantní (výsledek je o různé koncentrace odchýlen vždy o stejnou hodnotu) a proporcionalní (výsledek se liší od hodnoty u všech hladin o stejný násobek).

Matematické vyjádření nesprávnosti může být vyjádřeno dvěma způsoby:

1) chyba absolutní (bias)

- naměřená hodnota minus správná hodnota

2) chyba relativní

- naměřená hodnota minus správná / správná hodnota

Správnost tedy můžeme shrnout následovně: Správnost vyjadřuje shodu mezi výsledky měření a skutečnou hodnotou, která není v praxi nikdy zcela známa - provádí se její odhad (např. pomocí referenční metody).

#### **Vztah mezi přesností a správností:**

Výsledky mohou být:

- přesné a správné
- přesné a nesprávné
- nepřesné a správné
- nepřesné a nesprávné

---

<sup>5</sup> čerpáno z [7]

### 5.2.3 Linearita

Linearita je schopnost metody dávat výsledky přímo úměrné koncentraci stanovované látky ve vzorku. [5]

Při určení linearity a následných testů platí následující akceptační kritéria:

- počet kalibračních vzorků je minimálně 5 (obsahy analytu  $x$  jsou v oblasti  $x_{\min}$  až  $x_{\max}$ ) a pro každou koncentrační hladinu se stanoví nejméně dvakrát (tzn. minimálně získáme 10 údajů). Provede se regresní analýza všech dat a ne pouze jejich průměrných hodnot – uvádí se korelační koeficient, směrnice, y-úsek a chyby stanovení všech těchto hodnot. [1]

Korelační koeficient je mírou linearity, směrnice a y-úsek mírou vedlejších úseků. [5]

- směrnice kalibrační křivky se ověřuje před každou analýzou (nejméně ze dvou bodů) a testuje se podle Studentova t-testu. V případě, že rozdíl mezi hodnotami regresních koeficientů je statisticky významný, provede se recalibrace. [1]

Závislost u každé metody nemusí být lineární, může být vyjádřena jinou matematickou funkcí, ale pak je nutné při každém použití metody vyhodnocovat výsledky z celé kalibrační křivky. Linearita analytické metody se doloží buď graficky, jako závislost výsledků na koncentraci stanovované látky nebo matematicky pomocí výsledků lineární regresní analýzy. Jak již bylo uvedeno, uvádí se i korelační koeficient, směrnice, y-úsek, chyby stanovení těchto hodnot. [5]

Státní ústav pro kontrolu léčiv požaduje potvrzení linearity v rozmezí 50-100% deklarovaného obsahu a stanovení minimálně 5 různých koncentrací standardní látky, protože rušivé vlivy, které by se projevíly při použití roztoku vzorku, se postihnou i u jiných parametrů, např: při testování selektivity nebo správnosti. Není požadováno doložení parametru rozsah. [5]

### Shrnutí linearity:

Linearita je schopnost dávat výsledky přímo úměrné koncentraci stanovované látky. Obvykle se stanovuje minimálně 5 různých koncentrací v rozmezí 50-150% deklarovaného obsahu. Může se pracovat s roztoky standardů, neboť rušivé vlivy u reálných vzorků jsou hodnoceny jinými parametry validace. Pokud je metoda lineární, lze s výhodou určit směrnici z jednoho kalibračního bodu. Pokud není, je třeba výsledky vyhodnocovat z celé kalibrační křivky.

### **5.2.4 Rozsah**

Rozsah chápeme jako interval mezi dvěma hladinami koncentrace stanovované látky, v němž je látka stanovena s takovou přesností, správností a linearitou, jak dokládají výsledky validace. Tento rozsah se experimentálně ověřuje, a to tak, že se ověří přesnost, správnost a linearita pro extrémní hodnoty uvnitř intervalu. [5]

Jinými slovy můžeme říci, že rozsah se obvykle odvozuje z linearity metody a rozumí se jím koncentrační hranice, v kterých může být metoda používána. Dolním limitem může být například detekční limit a horní může být určen maximální odezvou, při jejímž překročení už přístroj nepracuje přesně. [6]

### **5.2.5 Selektivita <sup>6</sup>**

Selektivita metody je vlastnost změřit správně a specificky danou látku v přítomnosti jiných látek, jež lze očekávat. To mohou být další účinné látky u složených přípravků, pomocné látky, nečistoty z výroby, rozkladné produkty, zbytková rozpouštědla.

Je nutné doložit, že metoda je dostatečně selektivní pro dané použití. Metoda pro stanovení obsahu účinné látky nesmí být rušena výchozími látkami, vedlejšími produkty, pomocnými látkami, dalšími složkami přípravku nebo zbytkovými rozpouštědly. Tento parametr se doloží výsledky analýzy standardu,

---

<sup>6</sup> čerpnáno z [5]

a dále např. vzorků bez analyzované látky, obsahujících všechny složky přípravku, rozkladné produkty, nečistoty.

Metoda pro disoluci nebo obsahovou stejnoměrnost nemusí být selektivní.

Na celou analýzu přípravku je nutné dohlížet komplexně. Např. rutinní metoda pro stanovení obsahu nemusí být selektivní, je-li doplněna další zkouškou na čistotu. Nebo metoda používaná pro stanovení obsahu pouze při výstupní kontrole nemusí být selektivní – vzhledem k rozkladným produktům. Zatímco metoda používaná při stabilitních zkouškách nesmí být v žádném případě rozkladnými produkty rušena.

Selektivita se vyjadřuje jako rozdíl mezi výsledky analýzy vzorku bez nečistot a vzorku s přidanými rozkladnými produkty, složkami placeba nebo různými nečistotami. Jsou-li nečistoty nebo rozkladné produkty neznámé nebo nedostupné, je možné selektivitu prokázat jako výtěžnost standardního přípravku čisté látky k materiálu, obsahujícímu stále množství jiných látek. Jinou možností je srovnání výsledků analýzy vzorku obsahujícího nečistoty s výsledky dalších zkoušek na čistotu.

SÚKL nepožaduje číselné doložení selektivity, ale je nutné předložit např. chromatogramy placeba, známých vedlejších a rozkladných produktů nebo chromatogramy vzorků po rozkladu teplem, světlem, hydrolýzou, oxidací a podobně.

### **5.2.6 Robustnost**

Robustnost je míra reprodukovatelnosti výsledků, které jsme získali analýzou jednoho homogenního vzorku v různých laboratořích, různými analytiky, na různých přístrojích a s různými činidly. Můžeme tedy říci, že robustnost je vlastně reprodukovatelnost výsledků z parametru přesnost. [5]

Je to míra schopnosti metody dávat přesné a správné výsledky a to i při menších změnách pracovních podmínek, ke kterým vždy dochází při provádění metody v jiné laboratoři, i když pracovní postup zůstává zachován. [5]

Znamená míru vlivu proměnných podmínek při provedení metody na její výsledky. [5]

Je také možné robustnost dokládat číselně - stanovením reprodukovatelnosti. [5]

SÚKL sice nepovažuje číselné doložení, ale považuje za nutné doložit v dokumentaci poznatky z vývoje metody, tj. upozornit na podmínky, které mohou ovlivnit výsledky, např. stabilita vzorku v roztoku, vliv pH a teploty, vliv různých šarží činidel, u HPLC vliv změny kolony, rámec změn eluentu a podobně. [5]

Shrneme-li tento parametr, platí: test způsobilosti vyjadřuje míru vlivu proměnných podmínek na výsledky analýzy. Sbírají se poznatky z vývoje metody a cílem je upozornit na podmínky, které mohou ovlivnit výsledky. Např. u HPLC se sledují vlivy, jako je složení mobilní fáze, pH vodné složky mobilní fáze, teplota na koloně, rychlost průtoku mobilní fáze, stabilita analyzovaných vzorků, rozdíl mezi kolonami různých šarží, případně i výrobců... [6]

### 5.2.7 Detekční limit <sup>7</sup>

Detekční limit vyjadřuje citlivost metody. Je to parametr, který se musí uvést u metod pro stanovení nečistot.

Je pro limitní testy, tj. testy, které pouze zjišťují, zda je daná látka nad nebo pod určitou hranicí.

Detekční limit můžeme definovat jako nejnižší detekovatelnou koncentraci látky, která není stanovena kvantitativně.

Stanovení tohoto parametru závisí na tom, zda se jedná o instrumentální metodu či neinstrumentální metodu:

- U neinstrumentálních metod se detekční limit hledá experimentálně - zanalyzují se vzorky o známé koncentraci stanovované látky a určí se minimální koncentrace, kdy je možné ještě látku detekovat .
- U instrumentálních metod se detekční limit stanovuje na základě šumu. Jeden z možných postupů je následující: stanoví se směrodatná odchylka odezvy slepého vzorku → její trojnásobek odpovídá detekčnímu limitu. Získaná hodnota se pak dále ověří analýzou příslušné koncentrace vzorku.

---

<sup>7</sup> čerpáno z [5]

### 5.2.8 Kvantitativní limit <sup>8</sup>

Kvantitativní limit opět vyjadřuje citlivost metody a je to parametr, který se musí uvést u metod stanovujících nečistoty.

Kvantitativní limit definujeme jako nejnižší koncentraci látky, která je stanovena s přijatelnou přesností a správností. Nutné je také dodat, že tento parametr je pro kvantitativní stanovení obsahu nečistot.

Jeho stanovení opět závisí na tom, zda se jedná o instrumentální metodu či neinstrumentální metodu (stejně tak jak tomu bylo u detekčního limitu). A opět platí, že:

- U neinstrumentálních metod se kvantitativní limit stanoví experimentálně - zanalyzují se vzorky o známé koncentraci stanovované látky a určí se minimální koncentrace.
- U instrumentálních metod se kvantitativní limit stanovuje na základě šumu. Jeden z možných postupů je následující: stanoví se směrodatná odchylka odezvy slepého vzorku  $\rightarrow$  její 10násobek odpovídá kvantitativnímu limitu. A opět se získaná hodnota ověří analýzou příslušné koncentrace vzorku.

### 5.2.9 Test způsobilosti systému

Test způsobilosti systému je nedílnou součástí validace. U fyzikálně-chemických metod (především u separačních metod) není v podstatě možné přesně definovat všechny podmínky, za kterých má být metoda použita, aby poskytovala spolehlivé výsledky. Při každém novém použití metody se neopakuje celá validace, ale jsou definována určitá kritéria, která musí být splněna, a která se obecně nazývají jako test způsobilosti analytického systému (např. stanovení léčiv HPLC). Při splnění požadavků se předpokládá, že dříve provedená validace platí. [6]

---

<sup>8</sup> čerpáno z [5]

### 5.2.10 Směrodatná odchylka ( $s_x$ )

Směrodatná odchylka je definována jako druhá odmocnina z rozptylu. Má tu výhodu, že vyjadřuje variabilitu v měrných jednotkách sledované veličiny. [8], [9]

Rozptyl (disperze, variance) je nejvýznamnější charakteristika variability statistického souboru. Je nejen mírou variability ve smyslu rozptýlení kolem střední hodnoty, nýbrž i ve smyslu vzájemného rozptýlení hodnot. Obdobnou informaci podává směrodatná odchylka. [9]

Protože je směrodatná odchylka náhodná veličina, nemůže být pokládána za obecně platnou charakteristiku dané analytické metody a musí být specifikována:

- pro přesně specifikovaný pracovní postup bez sebemenších odchylek, v hodnotě  $s_x$  musí být zahrnuty všechny zdroje variability, tedy i ty, které plynou z pracovního postupu (rozklad vzorku, rozpouštění, extrakce, ředění, konečné instrumentální měření), v případě jakékoli změny v pracovním postupu se musí hodnota směrodatné odchylky revalidovat
- musí být určena z dostatečně velkého počtu vzorků téhož materiálu, směrodatná odchylka platí pro danou koncentrační hladinu a materiál se nesmí určovat z jedné ověřovací série, ale z dlouhodobého měření [1]

### 5.3. Revalidace

Revalidace analytické metody musí být prováděna při každé změně výrobního postupu nebo změně složení přípravku. Rozsah revalidace je dán povahou změn. [5]

Podmínky revalidace systému nejsou obecně definovatelné, protože každá změna v celém analytickém systému vede zákonitě k jeho revalidaci. Každá změna musí být však posouzena individuálně, zda má prokazatelný vliv na konečný výsledek. V kladném případě je nutné provést revalidaci, avšak tato

revalidace nemusí být komplexní, ale pouze jako dílčí krok validačního programu (např. kalibrace, citlivost) s tím, že musí být zpětně určena směrodatná odchylka. [1]

Revalidaci tedy můžeme shrnout tak, že se jedná o opakovaný proces validace s cílem ujistit se, že změny v procesu/zařízení zavedené v souladu s postupy kontroly změn nebudou mít nepříznivý dopad na charakteristiku procesu a jakost výrobku. [6]

#### **5.4      *Validační protokol***

Validační protokol se odvolává na validační program, respektive konkrétní validační program. Do validačního protokolu se zaznamenávají všechna měření, výpočty i pomocné výpočty. Výsledky a závěry jsou zřetelně definované. Do validačního protokolu se uvádí datum jednotlivých zkoušek, jméno zodpovědného pracovníka a jména dalších pracovníků, kteří se podíleli na validačním programu. [1]

Má být připravena validační zpráva, která odkazuje na validační protokol a má shrnovat získané výsledky, uvádět připomínky ke zjištěným odchylkám a vyvozovat patřičné závěry, včetně doporučených změn za účelem nápravy nedostatků. [10]

Veškeré odchylky od validačního protokolu mají být zdokumentovány a příslušně odůvodněny. [10]

Validační zpráva má být uchovávána po dobu deseti let v tištěné podobě, elektornické podobě a nakonec i na CD romu.

#### **5.5      *Literatura***

Literární odkazy mohou být součástí jednotlivých článků validačního programu nebo se může uvést literární odkaz jako samostatná příloha validačního programu. [1]



Nakonec pro zjednodušení uvádím tabulku validačních parametrů.

Tab. 1 Validační parametry <sup>9</sup>

	identifikace	testování nečistot		obsah
		kvantitativní	kvalitativní	
správnost	-	+	-	+
přesnost- opakovatelnost	-	+	-	+
mezilehlá přesnost	-	+ *	-	+ *
selektivita	+	+	+	+
detekční limit	-	-	+	-
kvantitativní limit	-	+	-	-
linearita	-	+	-	+
rozsah	-	+	-	+
robustnost	-	+	-	+

\* neprovádí se, je-li provedena reprodukovatelnost

---

<sup>9</sup> čerpáno z [ 6 ]

## **6 Závěr**

Analytické metody mají být validovány, pokud není příslušná používaná metoda obsažena v příslušném lékopise či jiném uznávaném standardním prameni. Vhodnost všech používaných zkušebních metod má být nicméně ověřena v rámci skutečných podmínek použití a má být zdokumentována.

Metody mají být validovány s ohledem na charakteristiky obsažené v pokynech ICH pro validaci analytických metod. Stupeň prováděné analytické validace má odrážet účel analýzy a fázi výrobního procesu. [10]

Před zahájením validace analytických metod má být uvážena patřičná kvalifikace analytického zařízení. [10]

Mají být vedeny úplné záznamy o veškerých modifikacích validovaných analytických metod. Takovéto záznamy mají obsahovat důvod modifikace a příslušné údaje sloužící k ověření toho, že tato modifikace má stejně přesné a spolehlivé výsledky jako zavedená metoda. [10]

Má být vytvořen písemný validační protokol, kterým se určí, jak bude probíhat validace určitého procesu. Protokol má být zkontrolován a schválen jednotkou jakosti a dalšími určenými jednotkami. [11]

Validační protokol má specifikovat kritické kroky procesu a kritéria přijatelnosti, stejně jako typ validace, která má být provedena (např. retrospektivní, prospektivní, konkurenční) a kolikrát proces proběhne. [11]

Má být připravena validační zpráva, která odkazuje na validační protokol a má shrnovat získané výsledky, uvádět připomínky ke zjištěným odchylkám a vyvozovat patřičné závěry, včetně doporučených změn za účelem nápravy nedostatků. [11]

Veškeré odchylky od validačního protokolu mají být zdokumentovány a příslušně odůvodněny. [11]

Shrnutí zásad pro validaci: <sup>10</sup>

- Shromáždit a dokumentovat validační parametry a analytické znaky (údaje výrobců o analytických znacích metody/měřicího systému)
  - Shromáždit a dokumentovat příslušná kritéria (velikost analytických znaků specifikujících požadavky na to, aby měřicí systém splňoval zamýšlené použití)
    - Naplánovat validační experimenty
    - Před započítím experimentů provést dostatečné seznámení s přístrojem, metodou, podrobnou instruktáž personálu, prověření výpočetní techniky včetně statistických programů
      - Provést experimenty
      - V případě potřeby přehodnotit kritéria a opakovat experimenty
      - Shrnout a vyhodnotit výsledky formou validační zprávy
      - Navrhnout způsob řízení kvality (VKK, EHK)
      - Vypracovat příslušný SOP
      - Určit kritéria a plány revalidace

---

<sup>10</sup> čerpáno z [2]

## **7 Literatura**

- [1] <http://sweb.cz/HPLC/Suma/Validace.html> - 12/2005
- [2] <http://www.cskb.cz/doporuceni/validace.html> - 12/2005
- [3] <http://www.ecochem.cz/navrh.jsp?idSec=3-2-4> - 12/2005
- [4] <http://europa.eu.int/eur-lex/cs/dd/docs/2002/32002D0657-CS.doc> - 12/2005
- [5] J. Šabartová, Věstník SÚKL 1/1994, Státní ústav pro kontrolu léčiv (1993), Validace analytických metod, 6.
- [6] J. Klimeš a kol.: Kontrola léčiv II, Karolinum, Praha 2004
- [7] P. Nezbeda - Výuková témata SZŠ Lipová 2002
- [8] <http://new.euromise.org/czech/tajne/ucebnice/html/html/node6.html> - 12/2005
- [9] <http://homel.vsb.cz/~hom50/DATABAZE/SLBDBASE/DBS9GSTA.HTML> - 12/2005
- [10] [http://www.sukl.cz/\\_download/cs08pokynform/vyr/vyr26.rtf](http://www.sukl.cz/_download/cs08pokynform/vyr/vyr26.rtf) - 12/2005
- [11] Volume 4 Good manufacturing practices DOPLNĚK 15 – KVALIFIKACE A ...12/2005
- [12] ICH Topic Q2A - Validation of Analytical Methods: Definitions and Terminology (EU CPMP/ICH/381/95 - 3/2006
- [13] <http://www.usp.org/about USP/> - 3/2006
- [14] <http://www.ich.org/cache/compo/276-254-1.html> - 12/2005
- [15] přednáška z předmětu Analýza exogenních látek v biologickém materiálu - 11/2005