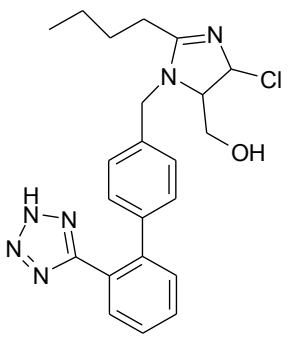
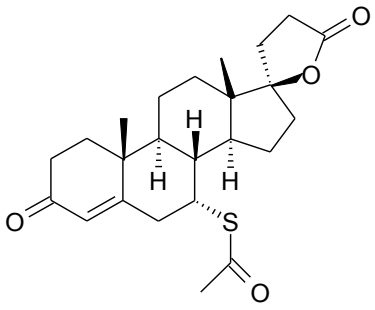
Ćwiczenie: Walidacja metody oznaczania losartanu, torasemidu, spironolaktonu i valsartanu metodą RP-HPLC



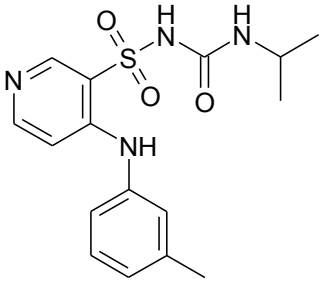
Losartan

(4-chloro-1-butyl-2-{[2'-(1H-tetrazol-5-ilo) bifenyl-4-ilo]metylo}-1H-imidazol-5-ilo) metanol



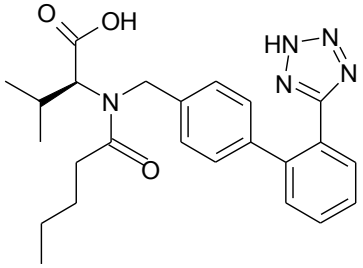
Spironolakton

7α-acetylotio-3-keto-17α-pregn-4-ene-21,17-karbolakton



Torasemid

N-[(izopropyloamino)karbonylo]-4-[(3-metylofenylo) amino] pirydyno-3-sulfonoamid



Valsartan

(S) -3-metylo-2- (N - {[2 '- (2H-1,2,3,4-tetrazol-5-ilo) bifenyl-4-ilo] metylo} pentanamido) butanowy kwas

Opracowano warunki rozdziału i przeprowadzono walidację substancji czynnych o działaniu hipotensyjnym z różnych grup farmakologicznych w wykorzystaniem metody HPLC-DAD.

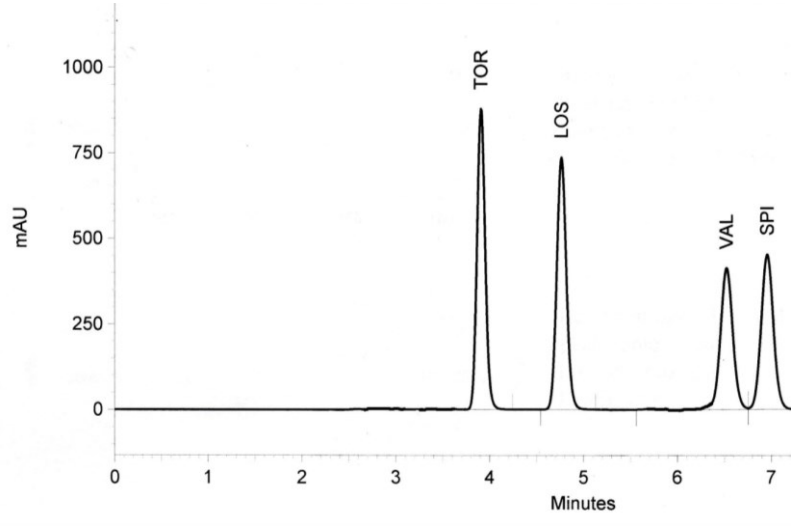
Walidacja metody jest systematyczną oceną postępowania analitycznego, mającą na celu wykazanie, że jest ono naukowo prawidłowe w warunkach, w których ma być zastosowane. Walidacja metody wymaga sprawdzenia następujących parametrów analitycznych: liniowości, granicy wykrywalności (LOD) i oznaczalności (LOQ), precyzji, precyzji pośredniej, dokładności, odporności metody (robustness).

1. Aparatura

Chromatograf cieczowy LaChrom Elite wyposażony w pompę tłokową, degazer, autosampler, kolumnę ACE C18 100A, Advanced Chromatography Technologies (**Aberdeen**, Scotland) – o średnicy ziaren 5 μm, długości 250 mm i średnicy wewnętrznej 4,6 mm wyposażoną w prekolumnę, detektor DAD, komputerowy system rejestracji i przetwarzania danych.

2. Warunki rozdziału i detekcji:

- faza ruchoma**:** bufor fosforanowy pH= 3,0 **-** acetonitryl - metanol (30 : 20 : 50 v/v/v)
- szybkość przepływu fazy ruchomej: 1,0 ml/min
- temperatura kolumny – 25^{o}C
- ciśnienie na wlocie kolumny - 125 bar
- objętość próbki dozowanej na kolumnę 20 μl
- detekcja spektrofotometryczna przy 230 nm



Rys 1. Przykładowy chromatogram rozdziału badanych związków uzyskany w zastosowanych warunkach chromatograficznych.

Liniowość

Określa zdolność uzyskiwania wartości mierzonych, które są wprost proporcjonalne do stężenia analitu w próbkach. W celu zbadania liniowości sporządzono 5 roztworów wzorcowych o różnych stężeniach i przeprowadzono analizę chromatograficzną w podanych powyżej warunkach.

Równanie prostej

$$\mathbf{y = ax + b}$$

a – współczynnik kierunkowy prostej

b - wyraz wolny

$$\boldsymbol{a = \frac{n\sum(xy) - \sum x \sum y}{n\sum x^2 - (\sum x)^2}}$$

$$\boldsymbol{b = \frac{\sum y - a\sum x}{n}}$$

$$\boldsymbol{r = \frac{n\sum(xy) - \sum x \sum y}{\sqrt{n\sum x^2 - (\sum x)^2]\,[n\sum y^2 - (\sum y)^2]}}}$$

Istotność wyrazu wolnego

Błąd standardowy wyrazu wolnego b obliczyć z wzoru:

$$S_b = S_y\sqrt{\frac{\sum x_i^2}{n\sum(x_i - \overline{x})^2}}$$

Równanie oceniające istotność wyrazu wolnego ma postać

$$t = \frac{b}{S_b}$$

Jeżeli $\mathbf{t < t_{\alpha,f}}$ **(α= 0,05 i f = n - 2)** to wyraz wolny jest nieistotny statystycznie.

α - poziom istotności

f – liczba stopni swobody

Tabela . Wartość współczynnika t w zależności od liczby stopni swobody

Stopnie swobody f	**Poziom istotności α = 0,05**
1	12,706
2	4,403
3	3,182
4	2,776
5	2,571
6	2,447
7	2,365
8	2,306
9	2,262
10	2,218

Na podstawie uzyskanych wyników oraz podanych wzorów obliczyć współczynniki kierunkowe prostych, wyrazy wolne, współczynniki korelacji oraz istotność wyrazów wolnych. Poprawność obliczonych wyników sprawdzić korzystając z programu Statystyka. Ponadto przy pomocy ww. programu dokonać analizy reszt za pomocą testu Shapiro – Wilka a uzyskane wyniki umieścić w sprawozdaniu.

Granica wykrywalności i oznaczalności

Za granicę wykrywalności (*limit of detection*) LOD przyjmuje się takie stężenie (ilość) analitu, który daje wartość sygnału analitycznego ok. 2-3 razy większą od poziomu szumów. Można ją również wyznaczyć ze wzoru:

$$\mathbf{LOD} = \frac{\mathbf{3,3\ S_y}}{\mathbf{a}}$$

Za granicę oznaczalności (*limit of quantitation*) LOQ przyjmuje się takie minimalne stężenie (ilość) analitu, które daje sygnał, umożliwiający uzyskanie precyzyjnych i dokładnych wyników. Akceptowany jest sygnał ok. 10 razy większy od poziomu szumów. Można ją również wyznaczyć ze wzoru:

$$\boldsymbol{LOQ} = \frac{\mathbf{10}\ \boldsymbol{S_y}}{\boldsymbol{a}}$$

a – współczynnik kierunkowy prostej

$\mathbf{S_y}$ - standardowy błąd estymacji

$$S_y = \sqrt{\frac{\sum(y_i - \widehat{y_i})^2}{n-2}}$$

y_i– uzyskana wartość **y**

$\widehat{y_i}$ - wartość **y** wyliczona z równania regresji **y= ax + b**

Korzystając z podanych powyżej wzorów oraz wyników analiz chromatograficznych obliczyć Sy oraz LOD i LOQ.

Precyzja i precyzja pośrednia

Precyzja wyraża stopień zgodności pomiędzy poszczególnymi wynikami analiz, powtarzanymi wielokrotnie np. dla n=6 na jednym poziomie stężeń lub dla n=3 na trzech poziomach stężeń. Do porównania precyzji wykorzystuje się wartość względnego odchylenia standardowego wyrażoną w procentach (%RSD).

Precyzja pośrednia - wyraża precyzję wyników otrzymanych w różnych dniach i wykonanych przez innego analityka ale w tym samym laboratorium.

$$S = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

$$RSD = \frac{S}{\bar{x}}\ 100\%$$

Na podstawie wyników uzyskanych dla precyzji i precyzji pośredniej otrzymanych dla 3 poziomów stężeń obliczyć wartości %RSD.

Dokładność

Sprawdza stopień zgodności uzyskanych wyników z wartością rzeczywistą. Dokładność można przedstawić jako % odzysku analitu dodanego do znanej ilości próbki lub jako różnicę pomiędzy średnią i akceptowaną wartością prawdziwą.

Korzystając z uzyskanych na chromatogramach pól powierzchni i stężenia dodanych wzorców losartanu, spironolaktonu, torasemidu i valsartanu obliczyć odzysk.

Zakres metody

Obejmuje obszar pomiędzy górnym i dolnym przedziałem stężeń w którym wykazano, że oznaczenia można prowadzić z akceptowaną precyzją, dokładnością i liniowością.

Obliczone wyniki walidacji metody oraz kryteria akceptacji umieścić w sprawozdaniu. Wyciągnąć wnioski czy metoda spełnia kryteria akceptacji i nadaje się do analizy ilościowej badanych związków w surowicy.

Literatura:

1. J. Pawełczyk, M. Zając „Walidacja metod analizy chemicznej. Przykład walidacji metod" Akademia im. Karola Marcinkowskiego, Poznań 2005.
2. ICH-Q2, (R1) Validation and Analytical Procedures: Text and Methodology, International Conference on Harmonization, Geneva, November 2005, http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf.