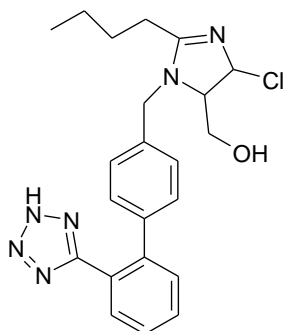
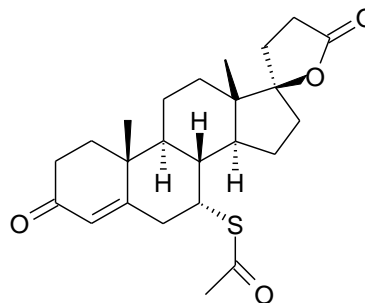


Walidacja metody HPLC-DAD oznaczania czterech substancji leczniczych w surowicy.



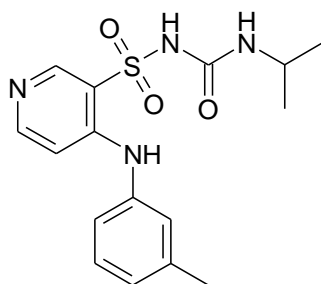
Losartan

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



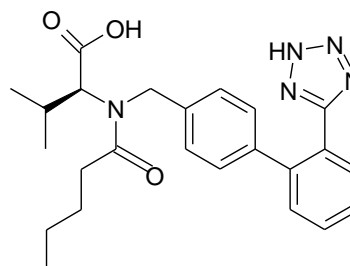
Spironolacton

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



Torasemid

N-[(izopropylamino)karbonylo]-4-[(3-metylofenylo) amino] pirydyno-3-sulfoamid



Valsartan

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

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

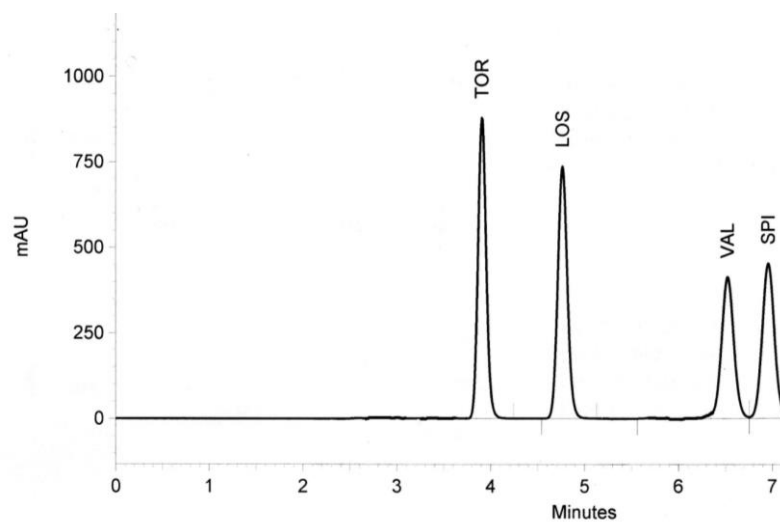
Walidacja metody jest systematyczną oceną postępowania analitycznego, mającą na celu wykazanie, że jest ono naukowo prawidłowe w warunkach, w których ma być zastosowane. Walidacja metody wymaga sprawdzenia następujących parametrów analitycznych: liniowości, granicy wykrywalności (LOD) i oznaczalności (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°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 obejmujących zakres od 50-150% dla substancji głównej w odniesieniu do oczekiwanych wyników analizy i przeprowadzono analizę

chromatograficzną w podanych powyżej warunkach. Odpowiedź detektora jako funkcja stężenia wzorców powinna być liniowa.

1. Przy pomocy programu Statistica wyznaczyć równanie prostej zależności wielkości pól powierzchni pików substancji badanej od jej stężenia.

Równanie prostej

$$y = ax + b$$

a – współczynnik kierunkowy prostej

b - wyraz wolny

2. Oszacować istotność współczynnika kierunkowego prostej i wyrazu wolnego na podstawie wartości p.
3. Podać wartości współczynnika korelacji r oraz determinacji r².

Weryfikacja założeń modelu liniowego:

4. Normalność rozkładu reszt – test Shapiro-Wilka.

H₀ – rozkład składnika losowego jest rozkładem normalnym.

Obliczyć wartość statystyki W.

Gdy:

$W > W_{n,\alpha}^*$ brak podstaw do odrzucenia hipotezy o normalności rozkładu reszt,

$W < W_{n,\alpha}^*$ odrzucamy hipotezę o normalności rozkładu reszt.

Gdzie: $W_{n,\alpha}^*$ - wartość krytyczna dla n prób na poziomie istotności $\alpha=0.05$.

5. Autokorelacja składnika losowego – test Durbina-Watsona.

H₀ – nie występuje autokorelacja składnika losowego.

Obliczyć wartość statystyki DW.

Gdy $DW < 2$ należy zweryfikować istnienie dodatniej autokorelacji:

- a. $DW < d_l$ odrzucamy hipotezę o braku autokorelacji i przyjmujemy, że w modelu jest dodatnia autokorelacja,
- b. $D_l < DW < d_g$ brak konkluzji, test nie rozstrzyga,

c. $DW > d_g$ brak podstaw do odrzucenia hipotezy o braku autokorelacji.

Gdy $DW > 2$ należy zweryfikować występowanie autokorelacji ujemnej:

- $DW > 4-d_l$ odrzucamy hipotezę o braku autokorelacji i przyjmujemy, że w modelu występuje ujemna autokorelacja,
- $4-d_g < DW < 4-d_l$ brak konkluzji, test nie rozstrzyga,
- $DW < 4-d_g$ brak podstaw do odrzucenia hipotezy o braku autokorelacji.

Jeżeli $DW = 2$ brak autokorelacji.

Gdzie: d_l, d_g – dolna i górna wartości krytyczne testu.

6. Jednorodność modelu (heteroskedastyczność) – test Bartleta.

H_0 – wariancja rozkładu reszt modelu jest stała.

$p > 0.05$ brak podstaw do odrzucenia hipotezy o jednorodności wariancji,

$p < 0.05$ odrzucamy hipotezę o jednorodności wariancji.

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:

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

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

Można ją również wyznaczyć ze wzoru:

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

a – współczynnik kierunkowy prostej

S_y - standardowy błąd estymacji

Precyzja i precyzja pośrednia

Precyzja wyraża stopień zgodności pomiędzy poszczególnymi wynikami analiz, powtarzаныmi 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.

Z uzyskanych na chromatogramach pól powierzchni i stężenia wzorców paracetamolu, kofeiny i witaminy C obliczyć procent odzysku:

$$R = \frac{X}{Y} \cdot 100\%$$

R – procent odzysku

X – oznaczone stężenie analitu

Y – rzeczywiste stężenie analitu

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.