



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών

Έλεγχος και Διασφάλιση Ποιότητας

Ενότητα 5: Επικύρωση / Επαλήθευση αναλυτικών
μεθόδων (1)

Κουμπάρης Μιχαήλ
Τμήμα Χημείας
Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας

ΟΡΙΣΜΟΙ (1)

Αναλυτική Τεχνική (analytical technique):

Γενική εφαρμογή ενός φυσικοχημικού φαινομένου (π.χ. απορρόφηση, διαχωρισμός λόγω κατανομής σε δύο φάσεις, ανάπτυξη διαφοράς δυναμικού).

Παραδείγματα: Φασματοφωτομετρία, Χρωματογραφία, Ποτενσιομετρία.



ΟΡΙΣΜΟΙ (2)

Αναλυτική Μέθοδος (analytical method):

Χρησιμοποίηση μιας αναλυτικής τεχνικής για την επίλυση ενός αναλυτικού προβλήματος (ποιοτικός ή/και ποσοτικός προσδιορισμός μιας συγκεκριμένης ουσίας ή ομάδας ουσιών σε συγκεκριμένο δείγμα).

Παραδείγματα: Ταυτοποίηση διγλιτοξίνης σε πρώτη ύλη με φασματοφωτομετρία υπερύθρου, ποσοτικός προσδιορισμός ακετυλοσαλικυλικού οξέος σε πρώτη ύλη με υδατική επανογκομέτρηση με οξύ, προσδιορισμός συγγενών ουσιών διφλουνισαλίου με HPLC.



ΟΡΙΣΜΟΙ (3)

Πορεία (procedure): Γενική περιγραφή των σταδίων για την εκτέλεση της μεθόδου.

Πρωτόκολλο (protocol): Λεπτομερής περιγραφή της πορείας ενός συγκεκριμένου προσδιορισμού που περιλαμβάνει ποσότητες αντιδραστηρίων και δείγματος, χρόνους εκτελέσεως διαφόρων σταδίων, πειραματικές συνθήκες, κλπ.



ΟΡΙΣΜΟΙ (4)

Αναλυτικό πρόβλημα (analytical problem):

Ερωτήματα που απευθύνονται προς το Εργαστήριο Ελέγχου (έλεγχος ταυτότητας, έλεγχος καθαρότητας, έλεγχος ορίων, ποσοτικός προσδιορισμός).

Ανάλυση (analysis): Εφαρμογή μιας ή περισσοτέρων αναλυτικών μεθόδων ή/και δοκιμασιών (δοκιμών) (testing, tests) σε ένα συγκεκριμένο δείγμα για την απάντηση / επίλυση ενός αναλυτικού προβλήματος.



ΟΡΙΣΜΟΙ (5)

Προσοχή: Οι όροι «ανάλυση» και «αναλύεται» αναφέρεται μόνο στο δείγμα και ποτέ στις ουσίες. Το δείγμα αναλύεται και οι ουσίες προσδιορίζονται.

Όμως ο αγγλικός όρος «analyte», αποδίδεται και ως «αναλύτης» αντί της «προσδιοριζόμενης ή υπό προσδιορισμό ουσίας». Προσοχή επίσης στους όρους: analyst (αναλυτής / αναλυτικός επιστήμονας) και analyzer (αναλυτής / αυτοματοποιημένο αναλυτικό όργανο).



ΟΡΙΣΜΟΙ (6)

Προσδιορισμός (determination): Το εργαλείο της ανάλυσης και αναφέρεται στις ουσίες του δείγματος.

Μπορεί να είναι:

Ποιοτικός (ταυτοποίηση) (identification)

Ποσοτικός (assay)

Έλεγχος ορίου (limit test)



ΟΡΙΣΜΟΙ (7)

Μέτρηση (measurement): Εισαγωγή του διαλύματος εργασίας του δείγματος στο αναλυτικό σύστημα και ανάγνωση / λήψη της προκαλούμενης τιμής του αναλυτικού σήματος. Δεν περιλαμβάνει το στάδιο προετοιμασίας του δείγματος.

Ανταποκρίνεται ακριβώς στην έννοια του αγγλικού όρου «run».

Εάν περιλαμβάνεται και το στάδιο προετοιμασίας του δείγματος χρησιμοποιείται ο όρος «προσδιορισμός».

Επαναλαμβανόμενες μετρήσεις ή προσδιορισμοί αναφέρονται με τον αγγλικό όρο “replicates”.



ΟΡΙΣΜΟΙ (8)

Βελτιστοποίηση (optimization) μεθόδου: Εύρεση εκείνων των πειραματικών συνθηκών που θα επιτρέψουν στην αναλυτική μέθοδο να έχει τη βέλτιστη απόκριση.

Βέλτιστη απόκριση (optimum response): αναφέρεται σε ένα ή περισσότερα χαρακτηριστικά ποιότητας, τα οποία συνδυάζονται στη λεγόμενη συνάρτηση απόκρισης (response function, RF) με τον αντίστοιχο συντελεστή βαρύτητας.



ΟΡΙΣΜΟΙ (9)

Παράδειγμα Συναρτήσεως Απόκρισης στις Μεθόδους HPLC:
Chromatographic Response Function (CRF)

$$CRF = \sum R_i + f_1 N + f_2 (t_A - t_n) + f_3 (t_1 - t_0)$$

R_i = διαχωριστικότητα μεταξύ γειτονικών κορυφών

N = αριθμός κορυφών

t_A = επιθυμητός χρόνος ανάλυσης

t_n = χρόνος έκλουσης τελευταίου συστατικού

t_1 = χρόνος έκλουσης πρώτου συστατικού

t_0 = επιθυμητός χρόνος έκλουσης 1ου συστατικού

f_1, f_2, f_3 : εμπειρικοί συντελεστές βαρύτητας



ΟΡΙΣΜΟΙ (10)

Παράδειγμα Συναρτήσεως Απόκρισης στις Φασματοφωτομετρικές Μεθόδους:

Συνάρτηση που περιλαμβάνει την ευαισθησία (κλίση καμπύλης αναφοράς), το όριο ανίχνευσης και την ειδικότητα.

Η βελτιστοποίηση επιτυγχάνεται με τη μελέτη της επίδρασης των πειραματικών συνθηκών στη συνάρτηση απόκρισης.

Εκτελείται με μεταβολή μιας παραμέτρου κάθε φορά (univariate procedure) ή περισσότερων της μιας συγχρόνως (simplex procedure).



ΟΡΙΣΜΟΙ (11)

Αναλυτική παράμετρος ή σήμα: η μετρούμενη φυσικοχημική ποσότητα που σχετίζεται με τη συγκέντρωση ή ποσότητα του αναλύτη.

Παραδείγματα:

Απορρόφηση ($A = \epsilon b c$)

Εμβαδόν χρωματογραφικής κορυφής

$$(A = k c)$$

Όγκος τιτλοδότη ($m = N V EW$)

Δυναμικό ($E = E' + S \log C$)

Ισχύς εκπεμπόμενης ακτινοβολίας ($P = k c$)



ΟΡΙΣΜΟΙ (12)

Χημική Πληροφορία – Πληροφορία Χρήστη:

Το αναλυτικό σήμα με τη βοήθεια της βαθμονόμησης (calibration) (καμπύλης αναφοράς ή βαθμονόμησης) μετατρέπεται σε χημική πληροφορία (συγκέντρωση ή περιεκτικότητα ουσίας, ταυτοποίηση).

Στη συνέχεια με βάση τη χημική πληροφορία συντάσσεται η απάντηση στο αναλυτικό πρόβλημα που έθεσε ο χρήστης, π.χ. εάν το δείγμα – πρώτη ύλη, όσον αφορά μια πρόσμειξη ανταποκρίνεται στα όρια της Φαρμακοποιίας.

Η απάντηση / γνωμάτευση (πιστοποιητικό ανάλυσης) αποτελεί την πληροφορία χρήστη.



ΟΡΙΣΜΟΙ (13)

Χημειομετρία (Chemometrics): Ο κλάδος της Χημείας (τείνει να γίνει αυτόνομος επιστημονικός κλάδος), που ασχολείται με την εφαρμογή μεθόδων:

- Στατιστικής
- Μαθηματικών
- Τυπικής Λογικής

στη Χημεία και άλλες επιστήμες, με στόχο:

- α) Σχεδιασμό πορειών (διαδικασιών) μετρήσεων και πειραμάτων
- β) Εξαγωγή της μέγιστης κατάλληλης χημικής πληροφορίας από την ανάλυση χημικών (γενικότερα πειραματικών) δεδομένων.



ΟΡΙΣΜΟΙ (14)

Σχήμα πορείας επίλυσης δεδομένου αναλυτικού προβλήματος:

1α. Επιλογή Μεθόδου

1β. Βελτιστοποίηση Μεθόδου

2α. Προετοιμασία Δείγματος

2β. Μέτρηση Αναλυτικής Παραμέτρου (Σήματος)

3α. Συλλογή Δεδομένων

3β. Μετατροπή Σήματος σε Χημική Πληροφορία (από καμπύλη αναφοράς)

3γ. Μετατροπή Χημικής Πληροφορίας σε Πληροφορία Χρήστη



ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΑΝΑΛΥΤΙΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ (1)

Ορισμός: Παράμετροι, ιδιότητες, κριτήρια ή συμπεριφορές, που εμφανίζει μια αναλυτική μέθοδος κατά την εφαρμογή της στην ανάλυση ενός δείγματος, και επιτρέπουν να αξιολογηθεί για την καταλληλότητα (ποιότητα) της για το σκοπό που έχει αναπτυχθεί.



ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΑΝΑΛΥΤΙΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ (2)

Τα χαρακτηριστικά ποιότητας, κατά κανόνα, ποσοτικοποιούν την καταλληλότητα / ποιότητα της μεθόδου και επιτρέπουν τη:

- α) Βελτιστοποίηση κατά το στάδιο ανάπτυξης ή μετά την επιλογή
- β) Σύγκριση μεταξύ μεθόδων κατά την επιλογή για την επίλυση ενός αναλυτικού προβλήματος.
- γ) Την επικύρωση ή επαλήθευση της μεθόδου.
- δ) Την αποδοχή της μεθόδου από επιστημονικούς φορείς (πρότυπη, αποδεκτή ή επιλογής).



ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΑΝΑΛΥΤΙΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ (3)

Προσοχή: Τα χαρακτηριστικά ποιότητας της μεθόδου, κατά κανόνα, αφορούν την πλήρη εφαρμογή όλων των σταδίων της μεθόδου σε ένα δείγμα (π.χ. προσδιορισμός μιας δραστικής φαρμακευτικής ουσίας σε δισκία).

Μερικά χαρακτηριστικά μπορούν να αναφέρονται και σε επί μέρους στάδια.

Παραδείγματα:

- επαναληψιμότητα συστήματος (οργάνου),
- όριο ανιχνεύσεως οργάνου (σε αντιδιαστολή του ορίου ανιχνεύσεως μεθόδου)
- χαρακτηριστικά σταδίου εκχύλισης, κλπ.



ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΑΝΑΛΥΤΙΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ (4)

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΟΡΟΛΟΓΙΑ

(Ελληνικό Κείμενο Κοινοτικής Οδηγίας (2002/657/ΕΚ))

- Accuracy:** Ακρίβεια
 - **Trueness:** Ορθότητα
- Precision:** Πιστότητα
 - **Repeatability:** Επαναληψιμότητα
 - **Reproducibility:** Αναπαραγωγιμότητα
 - **Intra-laboratory:** Ενδοεργαστηριακή
 - **Inter-laboratory:** Διεργαστηριακή
- Ruggedness:** Ανθεκτικότητα
- Detectability:** Ανιχνευσιμότητα
 - Detection Limit:** Όριο Ανίχνευσης
 - Quantitation Limit:** Όριο Ποσοτικοποίησης
- Specificity / Selectivity :** Ειδικότητα / Εκλεκτικότητα
- Sensitivity:** Ευαισθησία
- Linearity:** Γραμμικότητα
- **Working Range:** Περιοχή Εργασίας



ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ / ΕΠΑΛΗΘΕΥΣΗ ΑΝΑΛΥΤΙΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ – ΟΡΙΣΜΟΙ (1)

Επικύρωση (Validation):

Αξιολόγηση των χαρακτηριστικών ποιότητας της μεθόδου μέσω πειραματικής τεκμηρίωσης και η εξέταση της ανταπόκρισής της προς **προδιαγραφές (specifications)** για να αποδειχθεί ότι είναι κατάλληλη για τον σκοπό για τον οποίο προορίζεται (**fitness for purpose**).



ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ / ΕΠΑΛΗΘΕΥΣΗ ΑΝΑΛΥΤΙΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ - ΟΡΙΣΜΟΙ (2)

Επαλήθευση (Verification):

Επιβεβαίωση μέσω πειραματικής τεκμηρίωσης ότι μια επικυρωμένη μέθοδος με συγκεκριμένα χαρακτηριστικά ποιότητας και χαρακτηριζόμενη ως κατάλληλη για τον σκοπό για τον οποίο αναπτύχθηκε, εφαρμοζόμενη στο Εργαστήριο εξακολουθεί να ανταποκρίνεται προς τις απαιτούμενες προδιαγραφές.



- Το Εργαστήριο πρέπει να χρησιμοποιεί κατάλληλες μεθόδους και διαδικασίες για όλες τις δοκιμές που εμπίπτουν στο αντικείμενό του.
- Αποκλίσεις από τις μεθόδους δοκιμών επιτρέπονται μόνο εάν η απόκλιση έχει τεκμηριωθεί, έχει αιτιολογηθεί, έχει εγκριθεί αρμοδίως και έχει γίνει αποδεκτή από τον «πελάτη».



ΑΠΑΙΤΗΣΕΙΣ ΠΡΟΤΥΠΟΥ EN/ISO/IEC 17025
(Γενικές Απαιτήσεις για την Ικανότητα των Εργαστηρίων Δοκιμών και
Διακριβώσεων)
ΜΕΘΟΔΟΙ ΔΟΚΙΜΩΝ (§ 5.4.1)

- Το Εργαστήριο πρέπει να διαθέτει οδηγίες για την εκτέλεση κάθε μεθόδου.
- Διεθνή, περιφερειακά ή εθνικά πρότυπα ή άλλες αναγνωρισμένες προδιαγραφές που περιέχουν επαρκείς και περιεκτικές πληροφορίες για τον τρόπο εκτέλεσης των δοκιμών δεν χρειάζονται να συμπληρώνονται ή να ξαναγράφονται ως εσωτερικές διαδικασίες, με την προϋπόθεση ότι τα πρότυπα είναι γραμμένα με τρόπο που να μπορούν να χρησιμοποιηθούν όπως έχουν εκδοθεί από το προσωπικό λειτουργίας ενός Εργαστηρίου.
- Μπορεί να απαιτηθεί η παροχή πρόσθετης τεκμηρίωσης στην περίπτωση προαιρετικών βημάτων στη μέθοδο ή πρόσθετων λεπτομερειών.



ΑΠΑΙΤΗΣΕΙΣ ΠΡΟΤΥΠΟΥ EN/ISO/IEC 17025 ΕΠΙΛΟΓΗ ΜΕΘΟΔΩΝ (§ 5.4.2) (1)

- Το Εργαστήριο πρέπει να χρησιμοποιεί μεθόδους δοκιμών οι οποίες ικανοποιούν τον «πελάτη» και είναι κατάλληλες για τις δοκιμές που αυτό αναλαμβάνει.
- Πρέπει κατά προτίμηση να χρησιμοποιούνται μέθοδοι δημοσιευμένες σε διεθνή, περιφερειακά ή εθνικά πρότυπα.



ΑΠΑΙΤΗΣΕΙΣ ΠΡΟΤΥΠΟΥ EN/ISO/IEC 17025 ΕΠΙΛΟΓΗ ΜΕΘΟΔΩΝ (§ 5.4.2) (2)

- Το Εργαστήριο πρέπει να εξασφαλίζει ότι χρησιμοποιεί την τελευταία έγκυρη έκδοση του προτύπου , εκτός εάν αυτό δεν ενδείκνυται ή είναι αδύνατο.
- Όπου χρειάζεται, το πρότυπο πρέπει να συμπληρώνεται με πρόσθετες λεπτομέρειες, ώστε να εξασφαλίζεται η συνεπής εφαρμογή του.



ΑΠΑΙΤΗΣΕΙΣ ΠΡΟΤΥΠΟΥ EN/ISO/IEC 17025

ΕΠΙΛΟΓΗ ΜΕΘΟΔΩΝ (§ 5.4.2) (3)

Όταν ο «πελάτης» δεν καθορίζει τη μέθοδο, το Εργαστήριο επιλέγει ενδεδειγμένες μεθόδους:

- Δημοσιευμένες σε διεθνή, περιφερειακά, τοπικά ή εθνικά πρότυπα
- Δημοσιευμένες από αναγνωρισμένους τεχνικούς οργανισμούς.
- Δημοσιευμένες σε επιστημονικά κείμενα ή περιοδικά
- Καθοριζόμενες από τον κατασκευαστή του εξοπλισμού
- Αναπτυγμένες ή υιοθετημένες από το Εργαστήριο (Εσωτερικές , In House) (**ΕΠΙΚΥΡΩΜΕΝΕΣ**).



ΑΠΑΙΤΗΣΕΙΣ ΠΡΟΤΥΠΟΥ EN/ISO/IEC 17025

ΕΠΙΛΟΓΗ ΜΕΘΟΔΩΝ (§ 5.4.2) (4)

- Ο «πελάτης» πρέπει να πληροφορείται τη μέθοδο που επιλέγεται.
- Το Εργαστήριο πρέπει να επιβεβαιώνει ότι μπορεί να εκτελεί ορθώς τις πρότυπες μεθόδους πριν τη διενέργεια των δοκιμών (ΕΠΑΛΗΘΕΥΣΗ)
- Όταν η πρότυπη μέθοδος αλλάζει η επαλήθευση πρέπει να επαναλαμβάνεται.



ΑΠΑΙΤΗΣΕΙΣ ΠΡΟΤΥΠΟΥ EN/ISO/IEC 17025 ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΟΥ ΑΝΑΠΤΥΣΣΟΝΤΑΙ ΑΠΟ ΤΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ (§ 5.4.3)

- Προσχεδιασμένη δραστηριότητα
- Ανατίθεται σε προσωπικό αξιολογημένο ως κατάλληλο
- Διάθεση κατάλληλων πόρων
- Συνεχής ενημέρωση σχεδίου ανάπτυξης
- Αποτελεσματική επικοινωνία όλου του εμπλεκόμενου προσωπικού.



ΑΠΑΙΤΗΣΕΙΣ ΠΡΟΤΥΠΟΥ EN/ISO/IEC 17025

ΜΗ ΠΡΟΤΥΠΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ (§ 5.4.4) (1)

- Συμφωνία με «πελάτη»
- Περιλαμβάνουν σαφή προδιαγραφή των απαιτήσεων του «πελάτη» και το σκοπό της δοκιμής.
- Οι αναπτυσσόμενες μέθοδοι πρέπει να **ΕΠΙΚΥΡΩΝΟΝΤΑΙ** κατάλληλα πριν από τη χρήση.



ΑΠΑΙΤΗΣΕΙΣ ΠΡΟΤΥΠΟΥ EN/ISO/IEC 17025

ΜΗ ΠΡΟΤΥΠΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ (§ 5.4.4) (2)

- Ανάπτυξη διαδικασίας / οδηγίας για νέες μεθόδους:
 - Αναγνώριση ταυτότητας μεθόδου
 - Αντικείμενο
 - Περιγραφή αντικειμένου που υποβάλλεται σε δοκιμή
 - Παράμετροι ή μεγέθη που προσδιορίζονται
 - Συσκευές και εξοπλισμός και απαιτήσεις τεχνικής επίδοσης
 - Απαιτούμενα πρότυπα αναφοράς και υλικά αναφοράς
 - Απαιτούμενες περιβαλλοντικές συνθήκες, περίοδος σταθεροποίησης



ΑΠΑΙΤΗΣΕΙΣ ΠΡΟΤΥΠΟΥ EN/ISO/IEC 17025

ΜΗ ΠΡΟΤΥΠΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ (§ 5.4.4) (3)

- Περιγραφή διαδικασίας [χειρισμός δείγματος, έλεγχοι πριν την έναρξη, έλεγχος καλής λειτουργίας εξοπλισμού, καταχώριση σε αρχείο των παρατηρήσεων και αποτελεσμάτων, μέτρα ασφαλείας].
- Κριτήρια ή/και απαιτήσεις έγκρισης / απόρριψης
- Δεδομένα που καταχωρούνται, μέθοδος στατιστικής ανάλυσης και παρουσίασης.
- Αβεβαιότητα ή διαδικασία εκτίμησης της αβεβαιότητας.



ΑΠΑΙΤΗΣΕΙΣ ΠΡΟΤΥΠΟΥ EN/ISO/IEC 17025
ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΩΝ (VALIDATION OF METHODS) (§ 5.4.5) (1)

Επικύρωση: επιβεβαίωση, μέσω εξέτασης και παροχής αντικειμενικών αποδείξεων, ότι ικανοποιούνται οι ιδιαίτερες απαιτήσεις για συγκεκριμένη, σκοπούμενη χρήση.



ΑΠΑΙΤΗΣΕΙΣ ΠΡΟΤΥΠΟΥ EN/ISO/IEC 17025 ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΩΝ (VALIDATION OF METHODS) (§ 5.4.5) (2)

Επικυρώνονται:

- Μη πρότυπες μέθοδοι
- Μέθοδοι που σχεδιάζονται από το Εργαστήριο (In house methods).
- Πρότυπες μέθοδοι που χρησιμοποιούνται εκτός αντικειμένου
- Ενισχυμένες και τροποποιημένες πρότυπες μέθοδοι.

Έκταση επικύρωσης: όσο είναι απαραίτητο για να ικανοποιήσει τις ανάγκες της δεδομένης εφαρμογής ή του πεδίου εφαρμογής.



ΑΠΑΙΤΗΣΕΙΣ ΠΡΟΤΥΠΟΥ EN/ISO/IEC 17025
ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΩΝ (VALIDATION OF METHODS) (§ 5.4.5) (3)
ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗΣ

- Χρήση προτύπων αναφοράς ή υλικών αναφοράς.
- Σύγκριση αποτελεσμάτων με άλλες πρότυπες μεθόδους αναφοράς.
- Διεργαστηριακές συγκρίσεις



ΑΠΑΙΤΗΣΕΙΣ ΠΡΟΤΥΠΟΥ EN/ISO/IEC 17025
ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΩΝ (VALIDATION OF METHODS) (§ 5.4.5) (4)
ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗΣ

- Συστηματική αξιολόγηση παραγόντων που επηρεάζουν το αποτέλεσμα.
- Αξιολόγηση αβεβαιότητας αποτελεσμάτων με βάση τις θεωρητικές αρχές και πρακτική εμπειρία.

Τεκμηρίωση επιρροής αλλαγών στις επικυρωμένες μη πρότυπες μεθόδους και ανάγκες για επανεπικύρωση.



ΑΠΑΙΤΗΣΕΙΣ ΠΡΟΤΥΠΟΥ EN/ISO/IEC 17025

ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΩΝ (VALIDATION OF METHODS) (§ 5.4.5) (5)

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗΣ

1. Προδιαγραφή απαιτήσεων (Σημαντικές απαιτήσεις Φαρμακοποιίας και λοιπών Οδηγιών Φορέων).
2. Πειραματικός προσδιορισμός χαρακτηριστικών μεθόδου.
3. Έλεγχος ικανοποίησης (συμμόρφωσης) απαιτήσεων
4. Δήλωση Εγκυρότητας (καταλληλότητας για σκοπούμενη χρήση)
5. Τακτική ανασκόπηση για επαλήθευση συνεχούς ικανοποίησης απαιτήσεων του «πελάτη».

Επικύρωση είναι μια στάθμιση μεταξύ: κόστους, διακινδύνευσης και τεχνικών δυνατοτήτων.



ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΩΝ ΤΕΚΜΗΡΙΩΣΗ

Συνίσταται:

- Πρωτόκολλο (protocol) [γραπτό και εγκεκριμένο πριν την έναρξη, περιλαμβάνει κριτήρια αποδοχής]
- Δεδομένα ελέγχου (test data)
- Έκθεση (report)
- Καθιέρωση ενιαίου συστήματος αριθμώσεως / επισήμανσης πρωτοκόλλων και εκθέσεων.
- Επικυρωμένη μέθοδος: ανταποκρίνεται στα κριτήρια αποδοχής του πρωτοκόλλου ή όταν υπάρχει επαρκής δικαιολογία γι' αυτό.



ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΩΝ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΜΕΘΟΔΩΝ (ΔΙΕΘΝΕΣ ΣΥΝΕΔΡΙΟ ΕΝΑΡΜΟΝΗΣΗΣ , ICH)

Οι αναλυτικές μέθοδοι, για τις απαιτήσεις της επικύρωσης, ταξινομούνται σε 4 ξεχωριστές κατηγορίες:

1. Έλεγχοι ταυτοποίησης (identification tests)
2. Ποσοτικοί προσδιορισμοί για την περιεκτικότητα προσμίξεων (quantitative measurements for impurity content).
3. Έλεγχοι ορίων για προσμίξεις (limit tests for impurities)
4. Ποσοτικοί προσδιορισμοί δραστικών ουσιών (assays of active moieties)

Η έκταση της επικύρωσης εξαρτάται από τον τύπο της μεθόδου.



ΕΚΤΑΣΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ ΑΝΑΛΥΤΙΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΓΙΑ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ

Χαρακτηριστικό Μεθόδου	Έλεγχος Ταυτοποίησης	Έλεγχος Προσμίξεων - Ποσοτικοποίηση	Έλεγχος Προσμίξεων-Όρια	Ποσοτικός Προσδιορισμός Δραστικής Ουσίας
Γραμμικότητα	-	+	-	+
Επαναληψιμότητα Συστήματος	-	+	-(2)	+
Επαναληψιμότητα Μεθόδου	-	+	-(2)	+
Αναπαραγωγικότητα	-	+	-	+
Ακρίβεια	-	+	-	+
Ειδικότητα (1)	+	+	+	+
Όριο Ανίχνευσης	-	-	+	-
Όριο Ποσοτικοποίησης	-	+	-	-
Περιοχή	-	+	-	+
(1) Έλλειψη ειδικότητας σε μια μέθοδο μπορεί να αντιμετωπισθεί με μια άλλη υποστηρικτική αναλυτική μέθοδο			(2) Μπορεί να απαιτηθεί σε μερικές περιπτώσεις	



Χαρακτηριστικά Επικύρωσης της ICH ως προς Τύπο Αναλυτικής Διαδικασίας

Type of Analytical Procedure	<u>Impurity Testing</u>			
	Identification	Quantitative	Limit Tests	Assay
Accuracy	No	Yes	No	Yes
Precision				
Repeatability	No	Yes	No	Yes
Intern. precision	No	Yes	No	Yes
Specificity	Yes	Yes	Yes	Yes
LOD	No	No	Yes	No
LOQ	No	Yes	No	No
Linearity	No	Yes	No	Yes
Range	No	Yes	No	Yes



ΕΠΑΝΕΠΙΚΥΡΩΣΗ (REVALIDATION) ΑΝΑΛΥΤΙΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ

- Απαιτείται όταν γίνονται σημαντικές αλλαγές:
 - Στα όργανα
 - Ενός κρίσιμου προμηθευτή
 - Σύνθεση ενός προϊόντος
 - Της ίδιας της μεθόδου
- Η έκταση της επανεπικύρωσης εξαρτάται από τη φύση της αλλαγής.
- Η αιτία και η έκταση πρέπει να τεκμηριώνεται στο πρωτόκολλο επικύρωσης.

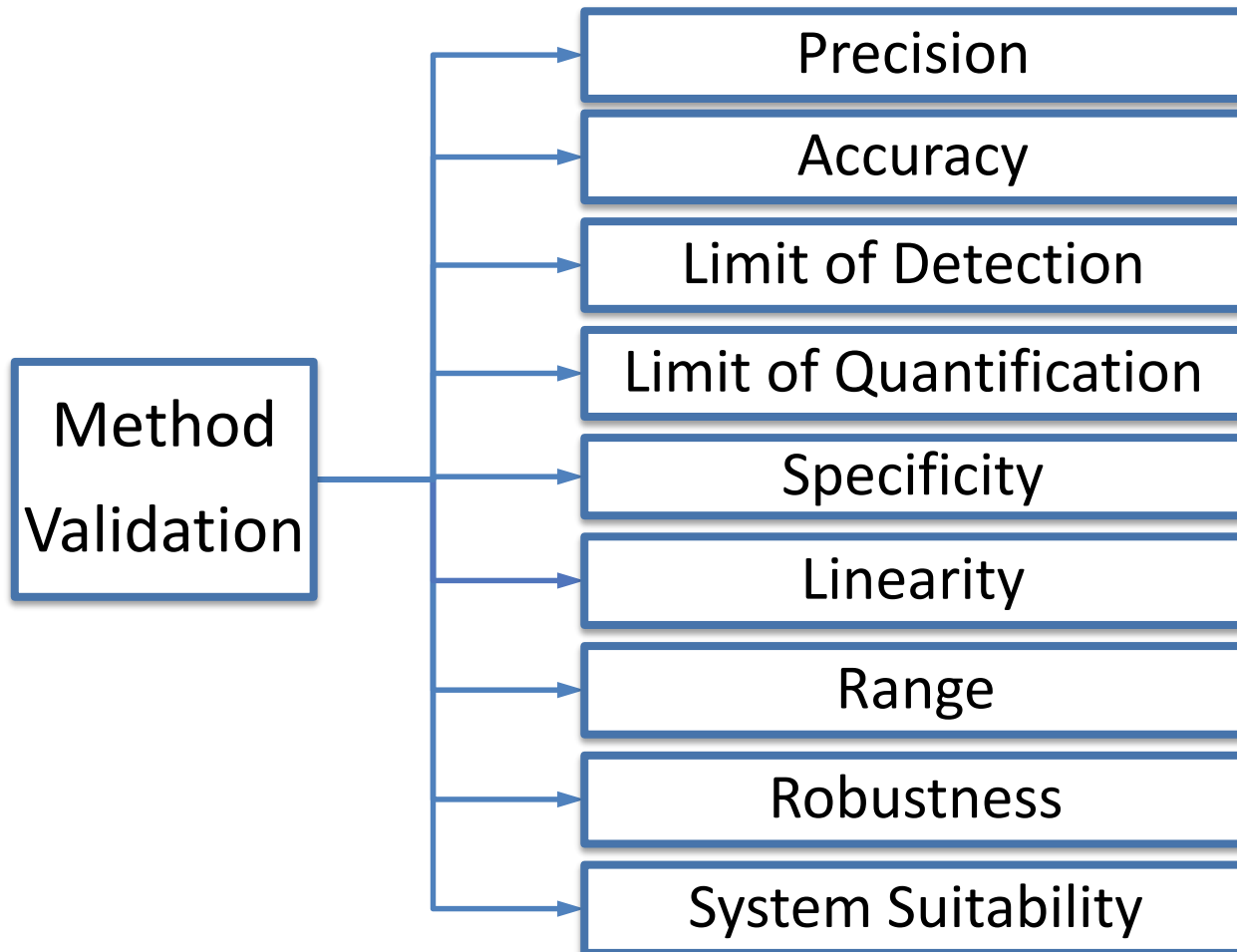


ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΕΛΕΓΧΟΥ ΑΝΑΛΥΤΙΚΩΝ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ

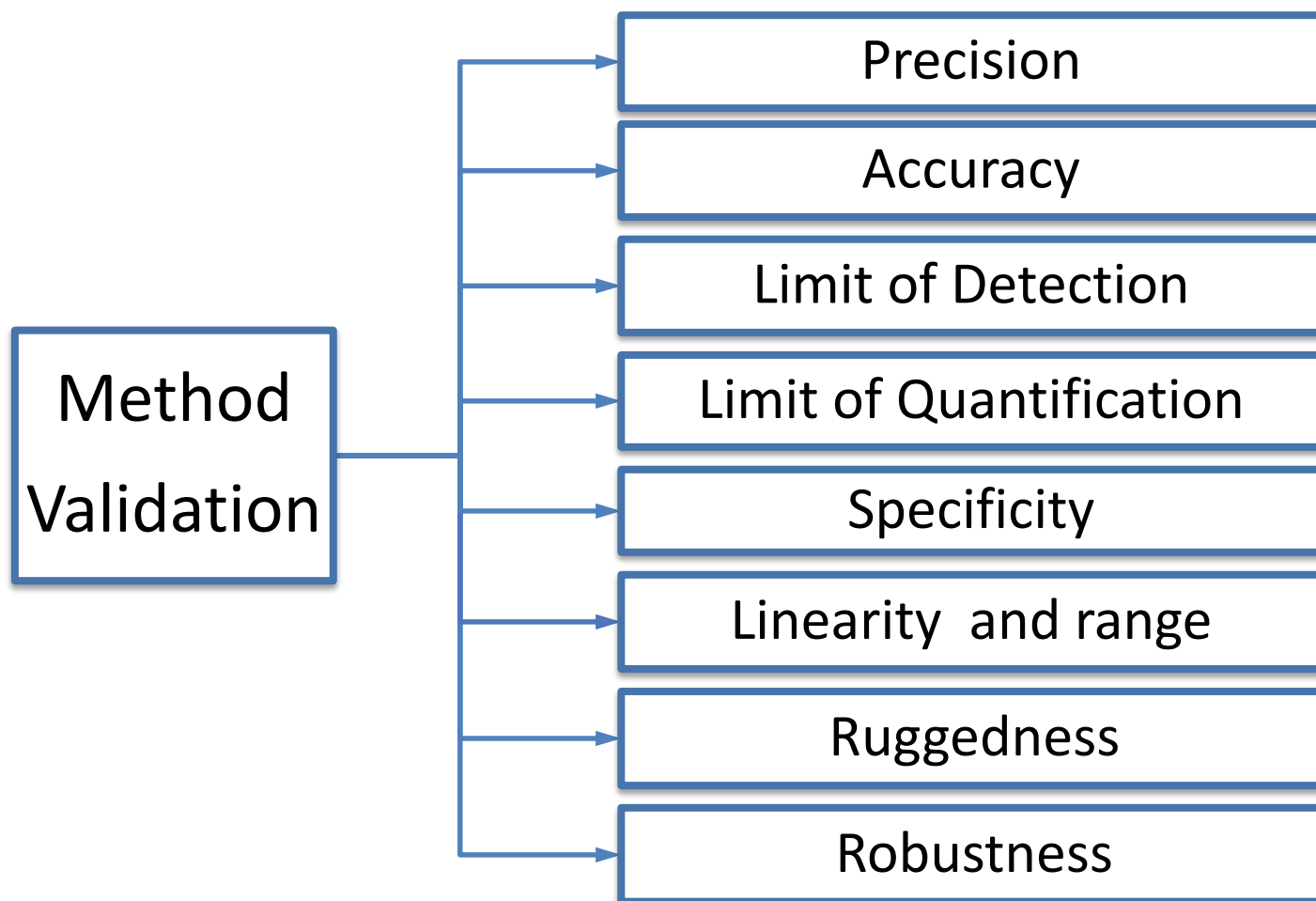
- Σχεδιάζεται η πειραματική εργασία έτσι, ώστε τα κατάλληλα χαρακτηριστικά ελέγχου επικύρωσης να εξετάζονται συγχρόνως, παρέχοντας ορθολογική και συνολική γνώση των δυνατοτήτων της αναλυτικής μεθόδου.
- Παράδειγμα σειράς ελέγχου:
 - Ειδικότητα
 - Γραμμικότητα
 - Περιοχή συγκεντρώσεων
 - Όριο ανίχνευσης / Όριο ποσοτικοποίησης
 - Ακρίβεια
 - Επαναληψιμότητα
 - Αναπαραγωγιμότητα



Παράμετροι Επικύρωσης Μεθόδων (Οδηγός International Committee for Harmonization, ICH)



Τα 8 βήματα της USP για επικύρωση μεθόδων



ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ (SPECIFICITY) ΚΑΙ ΕΚΛΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ (SELECTIVITY) (1)

Εκφράζει την παρεμπόδιση στον προσδιορισμό ενός συστατικού σε ένα δείγμα από τα άλλα συστατικά του μείγματος

Μια μέθοδος είναι πλήρως **ειδική (specific)** για ένα αναλύτη, εάν η συγκέντρωσή του μπορεί να προσδιορισθεί με ακρίβεια χωρίς επίδραση από τα άλλα συστατικά του δείγματος. Τα άλλα συστατικά δεν παράγουν αναλυτικό σήμα.



ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ (SPECIFICITY) ΚΑΙ ΕΚΛΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ (SELECTIVITY) (2)

Μια μέθοδος είναι πλήρως **εκλεκτική (selective)**, εάν παρέχει ορθά αναλυτικά αποτελέσματα για τα διάφορα συστατικά του μείγματος χωρίς αλληλεπίδραση μεταξύ τους. Μια εκλεκτική μέθοδος συνίσταται από μια σειρά ειδικών μετρήσεων.

Πολλές φορές δεν γίνεται διάκριση των δύο όρων και χρησιμοποιούνται ισοδύναμα



ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ (SPECIFICITY) ΚΑΙ ΕΚΛΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ (SELECTIVITY) (3)

Η έρευνα ειδικότητας απαιτείται στους ελέγχους (δοκιμασίες):

- Ταυτοποίησης
- Προσδιορισμών προσμίξεων
- Ποσοτικών προσδιορισμών

Η πορεία για την απόδειξη ειδικότητας εξαρτάται από το σκοπό της μεθόδου.

Εάν δεν αποδειχθεί ειδικότητα συνιστάται συνδυασμός δύο ή περισσότερων αναλυτικών μεθόδων



ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ (SPECIFICITY) ΚΑΙ ΕΚΛΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ (SELECTIVITY) (4)

Ο έλεγχος ειδικότητας συνίσταται στην αξιολόγηση της αναλυτικής μεθόδου να διακρίνει τον αναλύτη από:

- Γνωστές προσμίξεις
- Υπολείμματα πρώτων υλών της σύνθεσης
- Μεταβολίτες
- Προϊόντα διασπάσεως
- Συστατικά του μητρικού υλικού του δείγματος



ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ ΜΕΘΟΔΩΝ ΕΛΕΓΧΟΥ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ

(1)

Έλεγχος ικανότητας διάκρισης μεταξύ ενώσεων παραπλήσιας δομής.

Επιβεβαίωση ικανότητας διάκρισης με λήψη θετικών αποτελεσμάτων από δείγματα που περιέχουν τον αναλύτη (π.χ γνωστά υλικά αναφοράς), σε συνδυασμό με αρνητικά αποτελέσματα από δείγματα που δεν περιέχουν τον αναλύτη.



ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ ΜΕΘΟΔΩΝ ΕΛΕΓΧΟΥ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ

(2)

Εφαρμογή του ελέγχου ταυτοποίησης σε ουσίες με όμοια ή παραπλήσια δομή προς τον αναλύτη και επιβεβαίωση ότι δεν λαμβάνονται θετικά αποτελέσματα.

Η επιλογή των δυνητικά παρεμποδιζουσών ουσιών βασίζεται στην λογική επιστημονική κρίση σχετικά με πιθανή παρουσία τους στο δείγμα.



ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ ΜΕΘΟΔΩΝ ΠΟΣΟΤΙΚΩΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΩΝ (ASSAY) ΚΑΙ ΕΛΕΓΧΩΝ ΠΡΟΣΜΙΞΕΩΝ (IMPURITY TESTS) (1)

Για τις χρωματογραφικές μεθόδους (μέθοδοι επιλογής για ελέγχους και προσδιορισμούς προσμίξεων (συγγενών ουσιών), απαιτούνται αντιπροσωπευτικά χρωματογραφήματα για την απόδειξη ειδικότητας και κάθε συστατικό πρέπει να επισημαίνεται κατάλληλα.



ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ ΜΕΘΟΔΩΝ ΠΟΣΟΤΙΚΩΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΩΝ (ASSAY) ΚΑΙ ΕΛΕΓΧΩΝ ΠΡΟΣΜΙΞΕΩΝ (IMPURITY TESTS) (2)

Οι κρίσιμοι διαχωρισμοί στη χρωματογραφία πρέπει να ερευνώνται σε κατάλληλο επίπεδο συγκεντρώσεων.

Η ειδικότητα αυτών των χρωματογραφικών τεχνικών (λόγω συμπροσδιορισμού πολλών ουσιών καλείται και εκλεκτικότητα, *selectivity*) αποδεικνύεται με τη διαχωριστικότητα (*Resolution, R*) γειτονικών κορυφών.



ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ ΜΕΘΟΔΩΝ ΠΟΣΟΤΙΚΩΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΩΝ (ASSAY) ΚΑΙ ΕΛΕΓΧΩΝ ΠΡΟΣΜΙΞΕΩΝ (IMPURITY TESTS) (3)

$$R = \frac{2(t_{R,B} - t_{R,A})}{w_A + w_B}$$

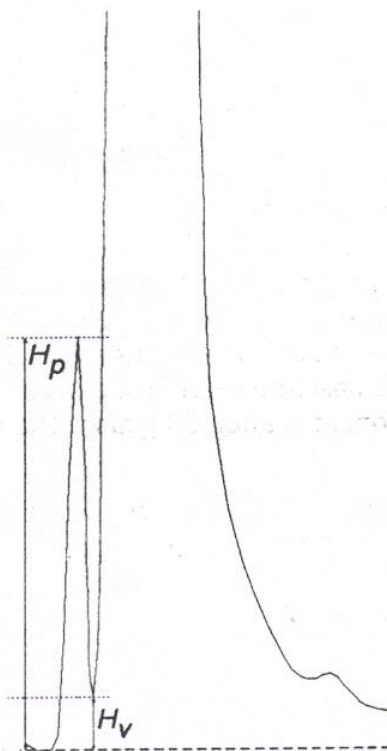
t_R = χρόνοι ανασχέσως (κατακρατήσεως)

w = εύρος κορυφών

$R \geq 2$, εάν $R \leq 1,5$ ελέγχεται ο λόγος ύψους κορυφής προς κοιλάδα (peak to valley ratio)



ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ «PEAK TO VALEY RATIO»



$$P/v = H_p/H_v$$

H_p = ύψος υπεράνω προέκτασης γραμμής βάσης της μικρής κορυφής

H_v = ύψος υπεράνω προέκτασης γραμμής βάσης του χαμηλότερου σημείου της κοιλάδας που χωρίζει τη μικρή και μεγάλη κορυφή



ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ ΜΕΘΟΔΩΝ ΠΟΣΟΤΙΚΩΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΩΝ (ASSAY) ΚΑΙ ΕΛΕΓΧΩΝ ΠΡΟΣΜΙΞΕΩΝ (IMPURITY TESTS) (2)

Σε περιπτώσεις χρήσεως μη-ειδικής (non-specific) μεθόδων προσδιορισμού, απαιτούνται και άλλες υποστηρικτικές αναλυτικές μέθοδοι για να αποδειχθεί **ολική ειδικότητα (overall specificity)**.

Παράδειγμα: Ογκομετρική μέθοδος προσδιορισμού πρέπει να συνδυασθεί με κατάλληλο έλεγχο προσμίξεων.

Η πορεία για απόδειξη ειδικότητας όμοια για μεθόδους ποσοτικού προσδιορισμού και ελέγχου προσμίξεων.



ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ ΜΕΘΟΔΩΝ ΠΟΣΟΤΙΚΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ – ΔΙΑΘΕΣΙΜΕΣ ΠΡΟΣΜΙΞΕΙΣ

Απόδειξη διάκρισης αναλύτη παρουσία των προσμίξεων και/ή εκδόχων (excipients).

Εμβολιασμός (spiking) καθαρής ουσίας ή σκευάσματος ή προϊόντος με κατάλληλα επίπεδα συγκεντρώσεων προσμίξεων ή/ και εκδόχων, και απόδειξη ότι το αποτέλεσμα του προσδιορισμού δεν επηρεάζεται από την παρουσία αυτών των υλικών (με σύγκριση προς το αποτέλεσμα του μη μολυσμένου δείγματος (unspiked sample)).



ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ ΜΕΘΟΔΩΝ ΕΛΕΓΧΟΥ ΠΡΟΣΜΙΞΕΩΝ – ΔΙΑΘΕΣΙΜΕΣ ΠΡΟΣΜΙΞΕΙΣ

Εμβολιασμός της ουσίας ή του προϊόντος με κατάλληλα επίπεδα συγκεντρώσεων των προσμίξεων και απόδειξη αποτελεσματικού διαχωρισμού αυτών των προσμίξεων, κάθε μιας ξεχωριστά και/ή από τα άλλα συστατικά του μητρικού υλικού.

Εναλλακτικά, για μεθόδους μικρότερης διακριτικής ικανότητας μπορεί να γίνει αποδεκτή η απόδειξη ότι αυτές οι προσμίξεις μπορούν να προσδιορίζονται με κατάλληλη ακρίβεια και επαναληψιμότητα.



ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ ΜΕΘΟΔΩΝ ΠΟΣΟΤΙΚΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΚΑΙ ΕΛΕΓΧΟΥ ΠΡΟΣΜΙΞΕΩΝ – ΜΗ ΔΙΑΘΕΣΙΜΕΣ ΠΡΟΣΜΙΞΕΙΣ (1)

Η ειδικότητα αποδεικνύεται με σύγκριση των αποτελεσμάτων των μεθόδων προσδιορισμού ή ελέγχου, δειγμάτων που περιέχουν προσμίξεις ή προϊόντα διασπάσεως προς τα αποτελέσματα μιας δεύτερης καλώς χαρακτηρισμένης μεθόδου (Φαρμακοποιίας, AOAC, LC-MS).

Η μελέτη αναλόγως περιλαμβάνει δείγματα υποβληθέντα σε σχετικά εξαναγκασμένες συνθήκες φωτός, θερμοκρασίας, υγρασίας, όξινης ή βασικής υδρόλυσης και οξειδωσης.



ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ ΜΕΘΟΔΩΝ ΠΟΣΟΤΙΚΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΚΑΙ ΕΛΕΓΧΟΥ ΠΡΟΣΜΙΞΕΩΝ – ΜΗ ΔΙΑΘΕΣΙΜΕΣ ΠΡΟΣΜΙΞΕΙΣ (2)

Για ποσοτικούς προσδιορισμούς: Τα δύο αποτελέσματα πρέπει να είναι συγκρίσιμα.

Για ελέγχους προσμίξεων: τα προφίλ των προσμίξεων πρέπει να είναι συγκρίσιμα.

Για χρωματογραφικές μεθόδους: Έλεγχος καθαρότητας (peak purity test) του αναλύτη (φασματοφωτομετρικός ανιχνευτής σειράς φωτοδιόδων, PDA), αποδεικνύει κορυφή προερχόμενη από ένα μόνο συστατικό.



ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ ΜΕΘΟΔΩΝ

Έγγραφα τεκμηρίωσης: Χρωματογραφήματα και δεδομένα που αποδεικνύουν αποδεκτή διαχωριστική ικανότητα.

Κριτήρια αποδοχής – Σχόλια: Οι συνυπάρχουσες ουσίες δεν πρέπει να παρεμποδίζουν τον προσδιορισμό του αναλύτη.

Σε περίπτωση παρεμποδίσσεως: Αναλυτικές μέθοδοι μιας διαστάσεως δεν είναι κατάλληλες.

Τεχνικές δύο διαστάσεων:

- Αεριοχρωματογραφία – φασματομετρία μαζών (GC-MS)
- Πολλαπλές στήλες επιβεβαίωσης (διαφορετικής πολικότητας)
- Υγροχρωματογραφία – ανιχνευτής σειράς φωτοδιόδων (HPLC –PDA)
- Αεριοχρωματογραφία – FTIR



ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ ΜΕΘΟΔΩΝ – ΤΡΟΠΟΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ (1)

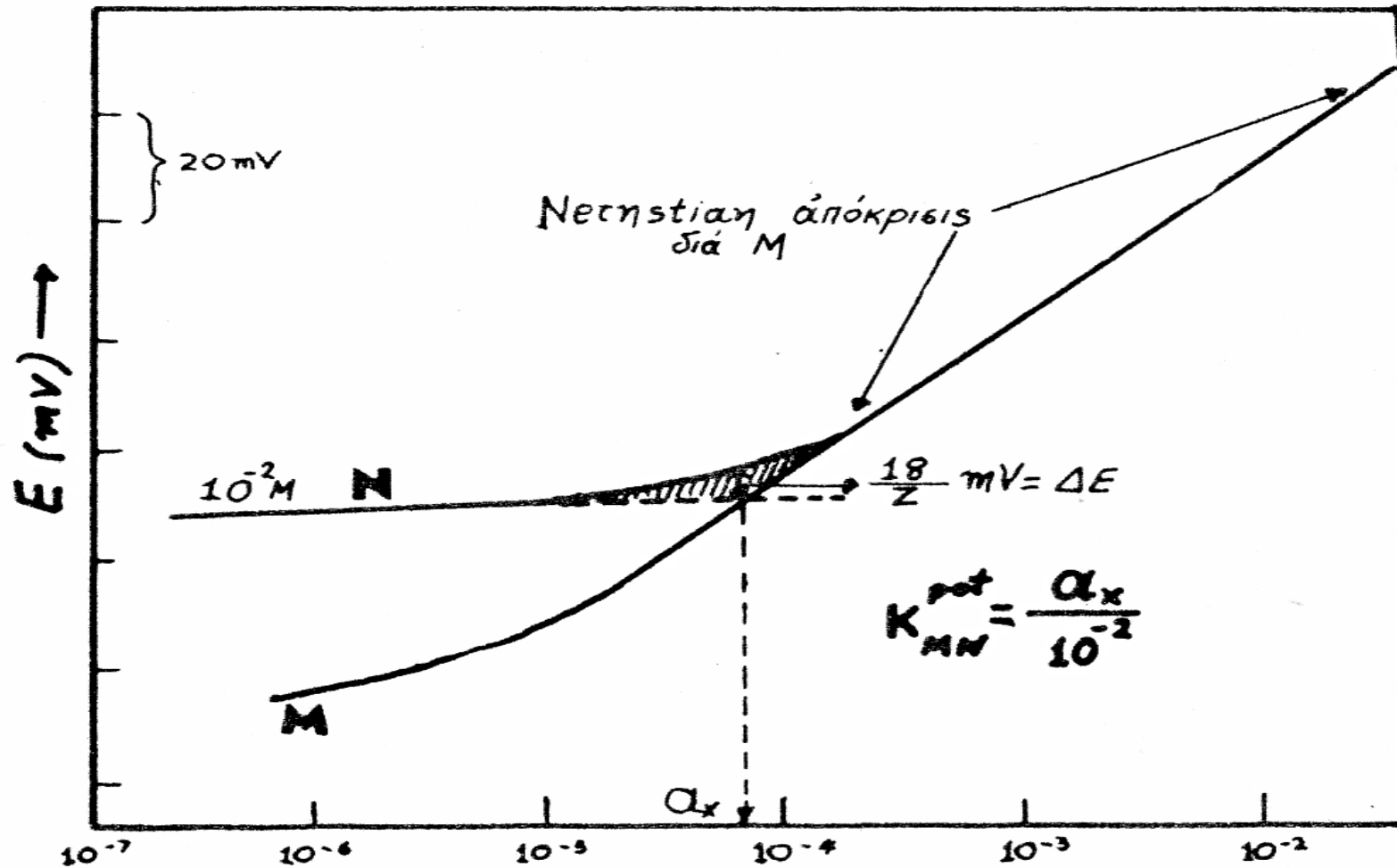
Γενικά: Λόγος συγκεντρώσεως παρεμποδιστή προς συγκέντρωση αναλύτη για πρόκληση σφάλματος (συνήθως) 5%. Η προκαλούμενη παρεμπόδιση εξαρτάται από συγκέντρωση αναλύτη.

Ποτενσιομετρία Εκλεκτικών Ηλεκτροδίων Ιόντων:
Ποτενσιομετρικός Συντελεστής Εκλεκτικότητας

$$E = E_{\text{const}} + S \log [C_A + K^{\text{pot}}_{A,B} \times C^{Z_A/Z_B}_B]$$



ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗ ΕΚΛΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ K_{MN}^{pot}



ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ ΜΕΘΟΔΩΝ – ΤΡΟΠΟΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ

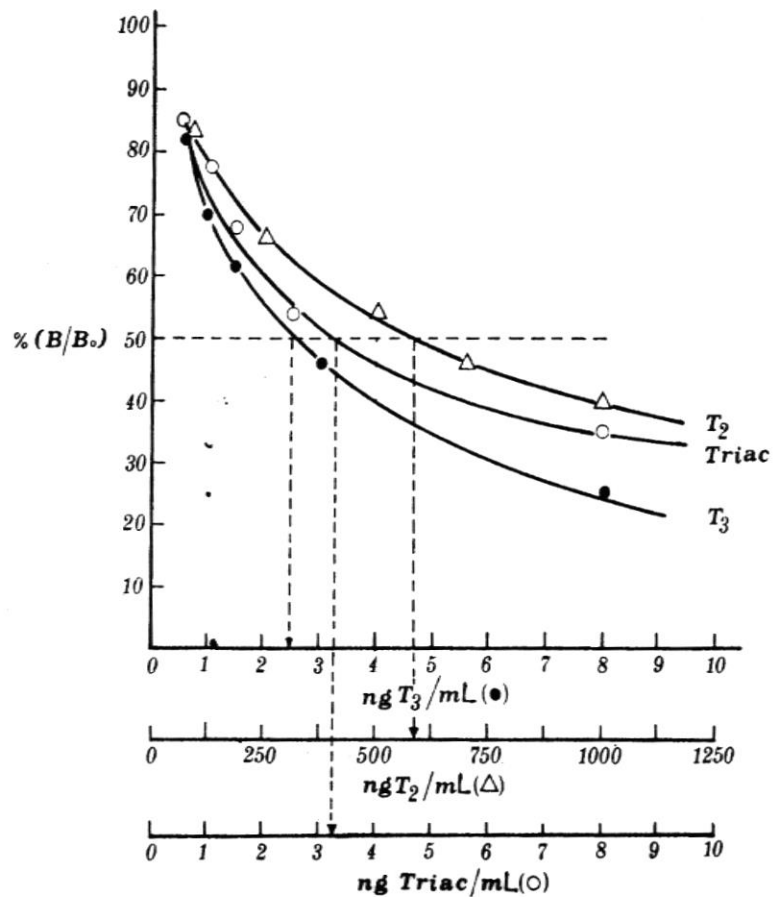
Ανοσοχημικοί Προσδιορισμοί:

Διασταυρούμενη Δραστικότητα (Cross Reactivity)

(Λόγος συγκεντρώσεως παρεμποδιστή προς συγκέντρωση αναλύτη για εκτόπιση ιχνηθέτη 50%)



ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΔΙΑΣΤΑΥΡΟΥΜΕΝΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΕ ΑΝΟΣΟΧΗΜΙΚΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ



ΓΡΑΜΜΙΚΟΤΗΤΑ (LINEARITY) (1)

Εξετάζεται σε όλο το εύρος της περιοχής συγκεντρώσεων (range) της αναλυτικής μεθόδου.

Αποδεικνύεται:

- Απευθείας στην καθαρή προσδιοριζόμενη ουσία (αραιώσεις ενός προτύπου διαλύματος παρακαταθήκης)
- η/και
- Ξεχωριστές ζυγίσεις συνθετικού μείγματος των συστατικών ενός προϊόντος, και εφαρμογή της ελεγχόμενης αναλυτικής μεθόδου (εξετάζεται κατά τον έλεγχο της περιοχής συγκεντρώσεων)



ΓΡΑΜΜΙΚΟΤΗΤΑ (LINEARITY) (2)

Αποδεικνύεται με οπτική εξέταση του διαγράμματος αναλυτικό σήμα ως προς συγκέντρωση ή περιεκτικότητα του αναλύτη.

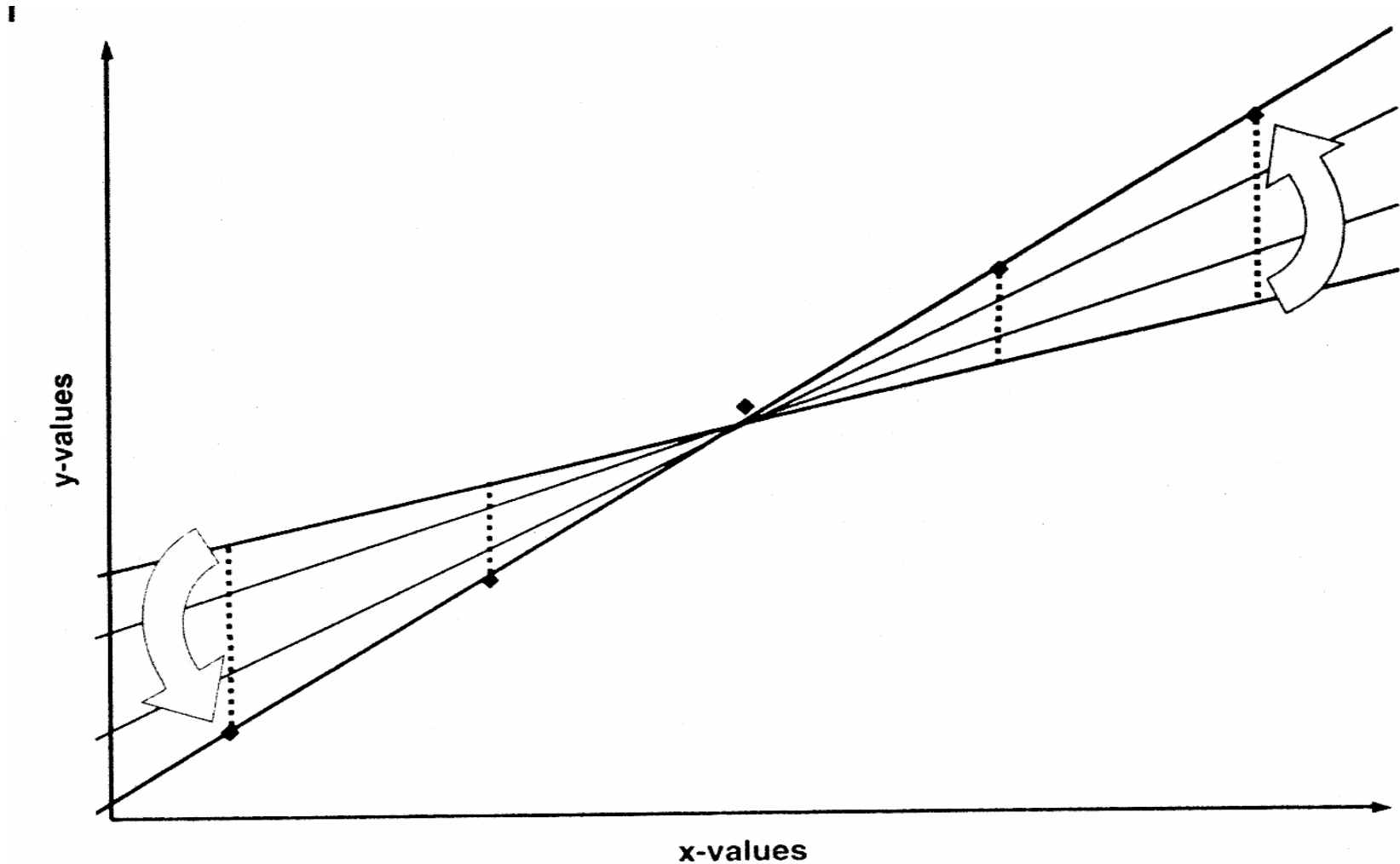
Αξιολογείται με στατιστικές μεθόδους (ανάλυση παλινδρόμησης ελαχίστων τετραγώνων, least squares regression analysis) και υπολογίζεται η εξίσωση της ευθείας παλινδρόμησης.

Ο συντελεστής συσχέτισεως (correlation coefficient), η τομή στον άξονα των y (y -intercept), η κλίση (slope) της ευθείας παλινδρόμησης και η τυπική απόκλιση των υπολοίπων ($S_{y/x}$) (τυπικό σφάλμα) περιλαμβάνονται στο φάκελο της μεθόδου.

$$Y = a (\pm S_a) + b (\pm S_b) X, r = \dots\dots\dots, S_{y/x} = \dots\dots\dots$$



ΑΡΧΗ ΠΑΛΙΝΔΡΟΜΗΣ ΕΛΑΧΙΣΤΩΝ ΤΕΤΡΑΓΩΝΩΝ



ΓΡΑΜΜΙΚΟΤΗΤΑ – ΠΟΡΕΙΑ ΕΛΕΓΧΟΥ (1)

- Παρασκευάζεται περιοχή προτύπων, τουλάχιστον 5 διαφορετικών συγκεντρώσεων του αναλύτη, κατανεμημένων περίπου ομοιόμορφα και που καλύπτουν 50 – 150% την αναμενόμενη περιοχή εργασίας. Για προϊόντα ακριβώς γνωστής σύστασης μπορεί να καλυφθεί περιοχή 75 – 125%.
- Εκτελούνται τουλάχιστον 6 επαναλαμβανόμενες μετρήσεις για κάθε συγκέντρωση.
- Τα πρότυπα παρασκευάζονται αν είναι δυνατόν στο ίδιο μητρικό υλικό με τα δείγματα.
- Τα πρότυπα αναλύονται με την αξιολογούμενη μέθοδο.



ΓΡΑΜΜΙΚΟΤΗΤΑ – ΠΟΡΕΙΑ ΕΛΕΓΧΟΥ (2)

Υπολογίζεται ο μέσος όρος (mean), η τυπική απόκλιση (standard deviation, SD), και η σχετική τυπική απόκλιση (relative standard deviation, RSD) για κάθε συγκέντρωση.

Γίνεται το διάγραμμα (plot) μέσης απόκρισης (mean response) (y-άξονας) ως προς τη συγκέντρωση (x-άξονας). Υπολογίζεται η εξίσωση παλινδρόμησης (regression equation)

$$Y = a + b X$$

Και ο συντελεστής προσδιορισμού (coefficient of determination) r^2 και ο συντελεστής συσχέτισης (r).

Οι υπολογισμοί αναγράφονται στο φύλλο δεδομένων.



ΓΡΑΜΜΙΚΟΤΗΤΑ – ΠΟΡΕΙΑ ΕΛΕΓΧΟΥ (3)

Εκτός από το διάγραμμα y ως προς x (διάγραμμα απόκρισης) γίνεται και το διάγραμμα του λόγου (απόκριση / συγκέντρωση) (response ratio) (y -άξονας) ως προς συγκέντρωση (x – άξονας). Ελέγχεται να είναι μία ευθεία γραμμή.

Εάν στο διάγραμμα απόκρισης – συγκέντρωσης, η τομή (intercept, a) είναι σημαντικά διαφορετική από το μηδέν (t-test, a/S_a), πρώτα αφαιρείται από κάθε απόκριση η τομή και στη συνέχεια διαιρείται με τη συγκέντρωση.



ΓΡΑΜΜΙΚΟΤΗΤΑ – ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΑΠΟΔΟΧΗΣ (1)

- Το διάγραμμα απόκριση – συγκέντρωση πρέπει να είναι ευθεία γραμμή με συντελεστή προσδιορισμού $r^2 \geq 0,98$ (προτιμάται 0,99 αλλά και 0,98 είναι αποδεκτό εξαρτώμενο από τις ανάγκες της μεθόδου).
- Οι αποκλίσεις των σημείων μακριά του μηδενός επηρεάζουν την κλίση περισσότερο από ό,τι οι αποκλίσεις των σημείων κοντά στο μηδέν.
- Εάν η καμπύλη δεν είναι γραμμική περιορίζεται η περιοχή έως ότου η απόκριση είναι γραμμική με τη συγκέντρωση. Τουλάχιστον 4 συγκεντρώσεις πρέπει να χρησιμοποιηθούν για την καμπύλη των προτύπων.



ΓΡΑΜΜΙΚΟΤΗΤΑ – ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΑΠΟΔΟΧΗΣ (2)

- Στο διάγραμμα λόγων απόκρισης οι τιμές πρέπει να βρίσκονται σε μια στενή οριζόντια ζώνη. Τιμές που είναι έξω από τη ζώνη είναι μη αποδεκτές για μια κανονική περιοχή εργασίας.
- Στο διάγραμμα των υπολοίπων (residual plot) ελέγχεται η εμφάνιση έκτροπων τιμών και η περιοχή γραμμικότητας.



ΓΡΑΜΜΙΚΟΤΗΤΑ – ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΑΠΟΔΟΧΗΣ (3)

- Το Καναδικό Τμήμα Προστασίας της Υγείας (CHPB) έθεσε κριτήρια συντελεστή προσδιορισμού $r^2 \geq 0,997$ για δραστική ουσία και $r^2 \geq 0,98$ για προσμίξεις.
- Λόγος τυπικών αποκλίσεων μικρότερου – μεγαλύτερου προτύπου εκτός της περιοχής 0,8-1,2 υποδηλώνει ετεροσκεδαστικότητα και απαιτεί χρήση **ζυγισμένης παλινδρόμησης**.



ΠΕΡΙΟΧΗ (ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΩΝ / ΠΟΣΟΤΗΤΩΝ) (RANGE) (1)

- Προκύπτει από τη μελέτη γραμμικότητας και εξαρτάται από τη σκοπούμενη εφαρμογή της μεθόδου.
- Αποδεικνύεται με την επιβεβαίωση ότι η αναλυτική μέθοδος παρέχει ένα αποδεκτό βαθμό γραμμικότητας, ακρίβειας και επαναληψιμότητας, όταν εφαρμόζεται σε δείγματα που περιέχουν ποσότητες/συγκεντρώσεις εντός ή στα άκρα της καθοριζόμενης περιοχής της αναλυτικής μεθόδου.



ΠΕΡΙΟΧΗ (ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΩΝ / ΠΟΣΟΤΗΤΩΝ) (RANGE) (2)

- Ιδανικά οι διάφορες συγκεντρώσεις παρασκευάζονται ανεξάρτητα και όχι από τμήματα του ιδίου αρχικού διαλύματος.
- Γενικά η περιοχή συγκεντρώσεων μιας αναλυτικής μεθόδου εκτείνεται από το όριο ποσοτικοποίησης μέχρι τη συγκέντρωση που παρατηρείται απόκλιση από τη γραμμικότητα κατά 1-2%.



ΕΛΑΧΙΣΤΕΣ ΚΑΘΟΡΙΖΟΜΕΝΕΣ ΠΕΡΙΟΧΕΣ (1)

Ποσοτικός προσδιορισμός δραστικής σε πρώτη ύλη ή έτοιμο προϊόν: 80 – 120% αναμενόμενης συγκεντρώσεως / περιεκτικότητας του δείγματος.

Προσδιορισμός πρόσμιξης:

- Από το όριο ποσοτικοποίησης (QL) της μεθόδου – 120% του ορίου
- Από το 50% - 120% του ορίου (όποιο είναι μεγαλύτερο)



ΕΛΑΧΙΣΤΕΣ ΚΑΘΟΡΙΖΟΜΕΝΕΣ ΠΕΡΙΟΧΕΣ (2)

Προσμίξεις πολύ δραστικές ή που προκαλούν τοξικές ή μη αναμενόμενες φαρμακολογικές δράσεις:

Το όριο ανίχνευσης / ποσοτικοποίησης πρέπει να είναι ανάλογο με το ελεγχόμενο όριο των προσμίξεων.



ΕΛΑΧΙΣΤΕΣ ΚΑΘΟΡΙΖΟΜΕΝΕΣ ΠΕΡΙΟΧΕΣ (3)

Σύγχρονη εκτέλεση ποσοτικού προσδιορισμού (assay) ουσίας σε πρώτη ύλη και έλεγχος καθαρότητας (purity) με HPLC:

- Χρησιμοποιείται μόνο ένα πρότυπο περιεκτικότητας 100%
- Η γραμμικότητα καλύπτει την περιοχή από το όριο ποσοτικοποίησης QL ή το 50% του ορίου κάθε πρόσμιξης (όποιο είναι μεγαλύτερο) έως το 120% του ορίου περιεκτικότητας της ουσίας στην πρώτη ύλη.



ΕΛΑΧΙΣΤΕΣ ΚΑΘΟΡΙΖΟΜΕΝΕΣ ΠΕΡΙΟΧΕΣ (4)

Έλεγχος ομοιομορφίας περιεχομένου (content uniformity) σκευασμάτων:

- Τουλάχιστον το 70 – 120% της ελεγχόμενης περιεκτικότητας, εκτός εάν κρίνεται απαραίτητο να καλυφθεί μια ευρύτερη περιοχή, εξαρτώμενη από τη φύση της δοσομετρικής μορφής (π.χ συσκευές εισπνοών μετρούμενων δόσεων).



ΕΛΑΧΙΣΤΕΣ ΚΑΘΟΡΙΖΟΜΕΝΕΣ ΠΕΡΙΟΧΕΣ (5)

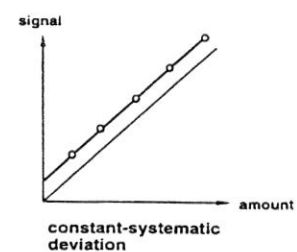
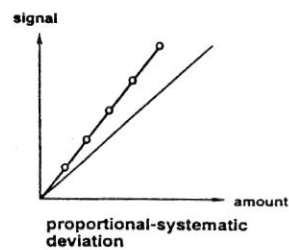
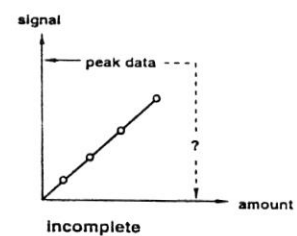
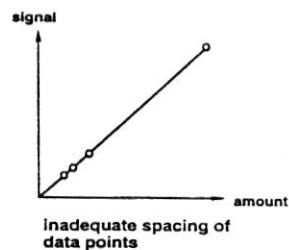
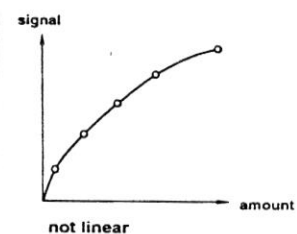
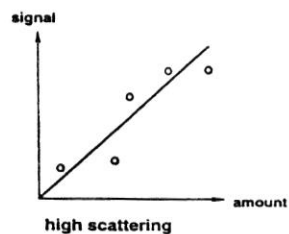
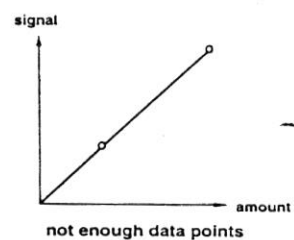
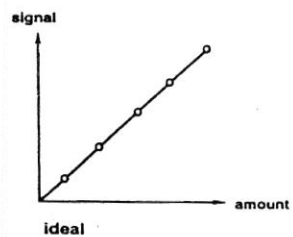
Έλεγχοι διαλυτοποίησης (dissolution testing) στερεών σκευασμάτων:

$\pm 20\%$ της καθοριζόμενης περιοχής.

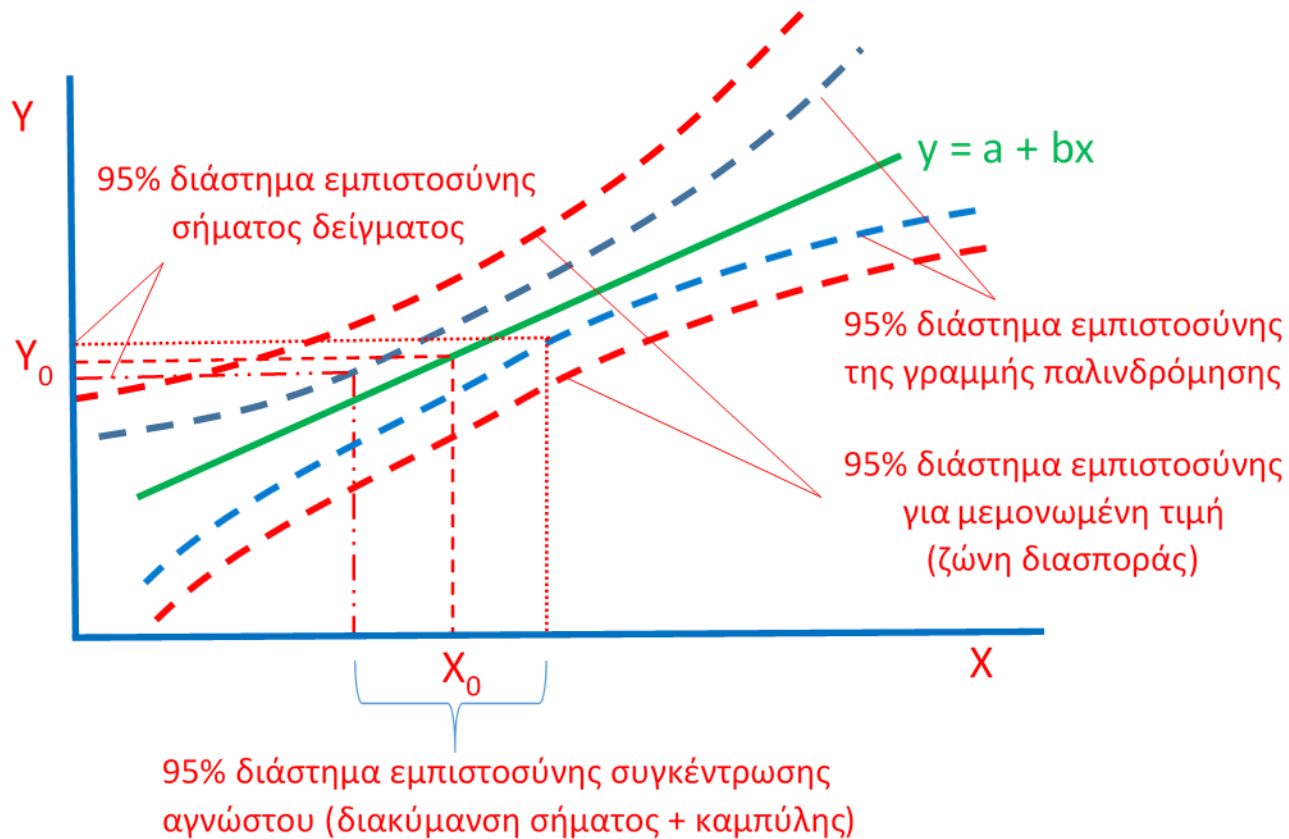
Π.χ. εάν οι προδιαγραφές ενός προϊόντος ελεγχόμενης αποδέσμευσης καλύπτουν μια περιοχή από 20%, μετά την 1η ώρα, έως 90% της περιεκτικότητας, μετά 24 ώρες, η ελεγχόμενη περιοχή πρέπει να είναι από 0 – 110% της αναγραφόμενης τιμής περιεκτικότητας.



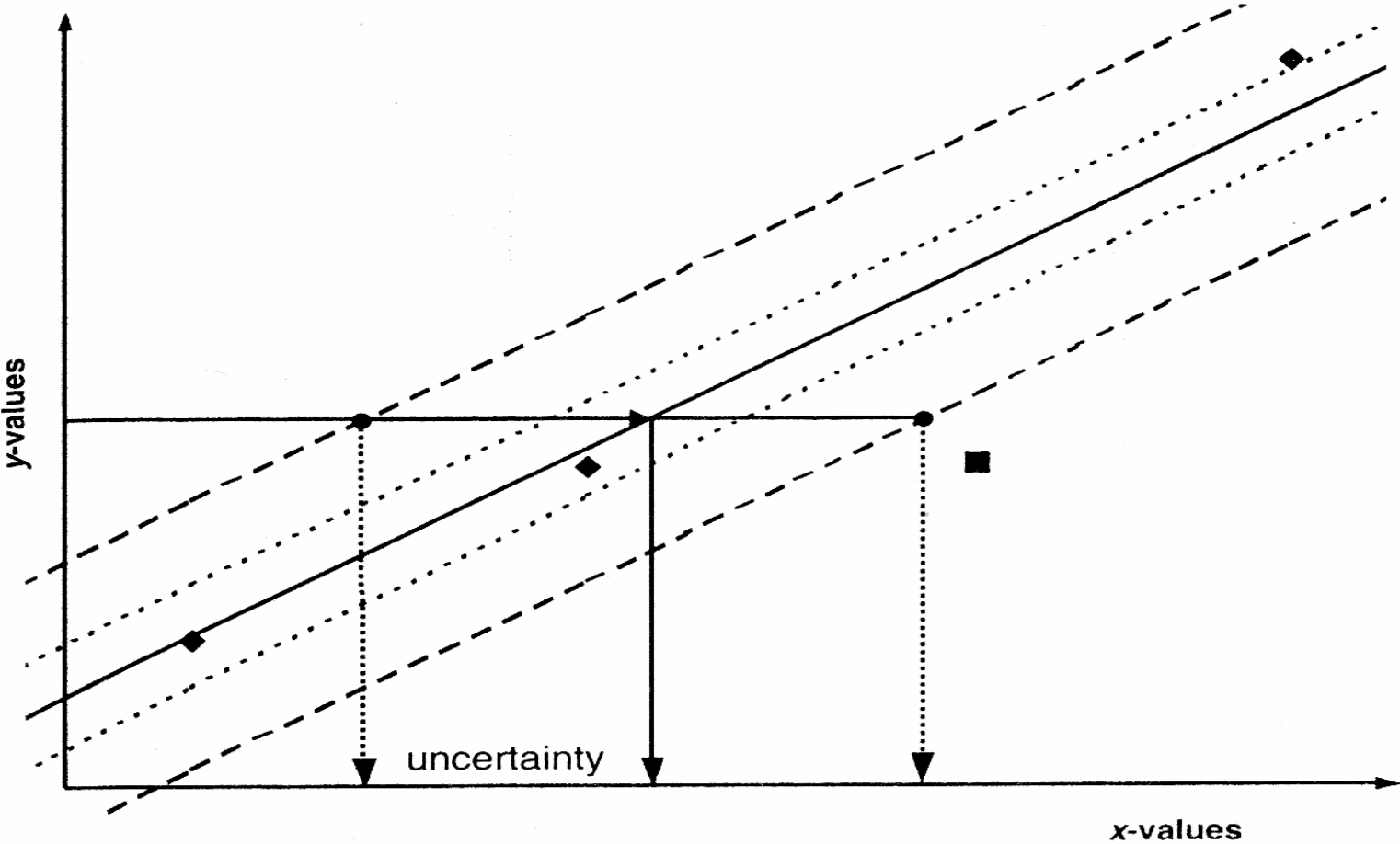
ΚΑΜΠΥΛΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ



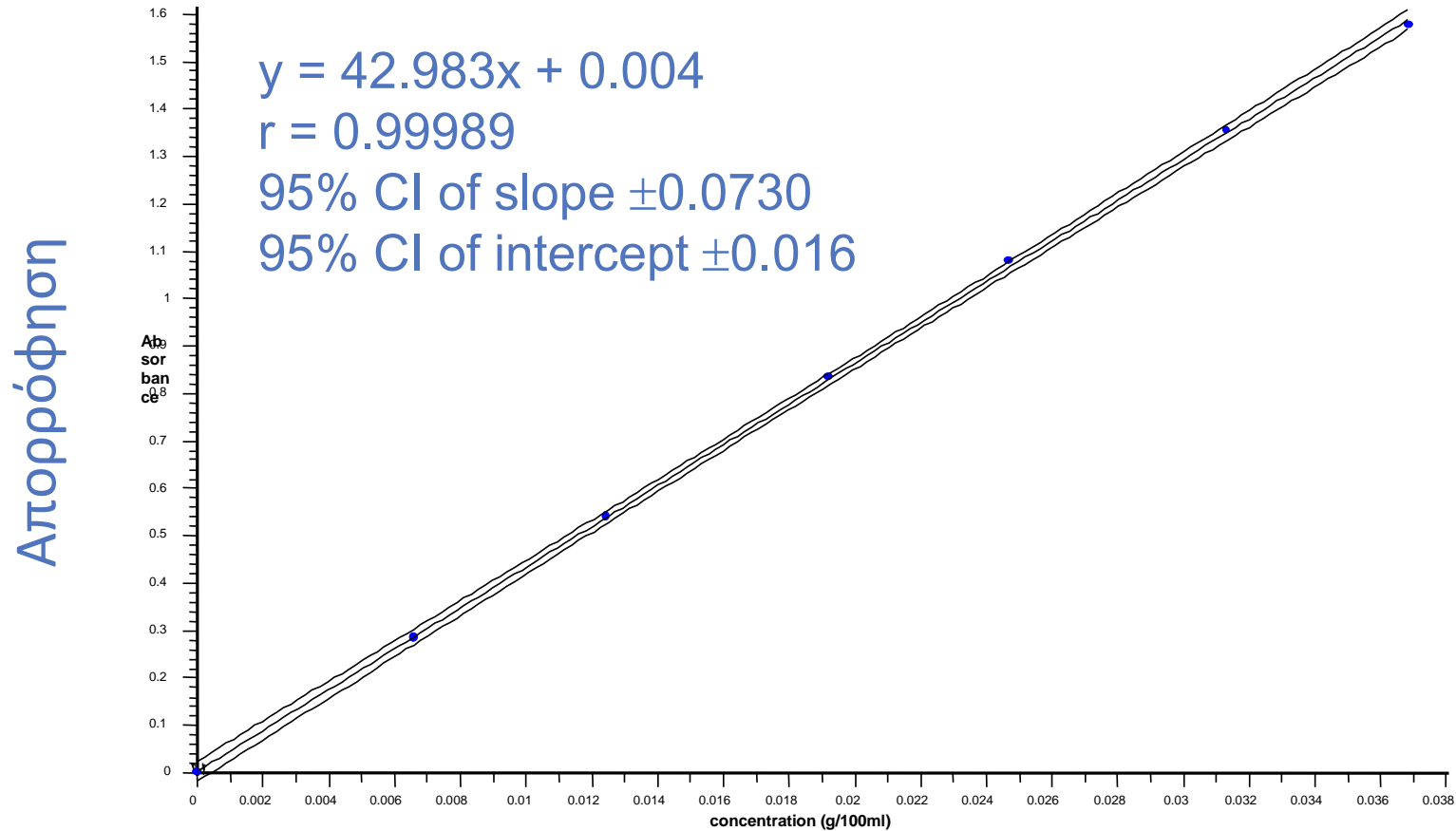
ΚΑΜΠΥΛΗ ΑΝΑΦΟΡΑΣ ΚΑΙ ΔΙΑΣΤΗΜΑΤΑ ΕΜΠΙΣΤΟΣΥΝΗΣ



ΚΑΜΠΥΛΗ ΓΡΑΜΜΙΚΗΣ ΠΑΛΙΝΔΡΟΜΗΣΗΣ ΜΕ ΟΡΙΑ ΕΜΠΙΣΤΟΣΥΝΗΣ ΚΑΙ ΑΒΕΒΑΙΟΤΗΤΑ



Linearity in the presence of placebo

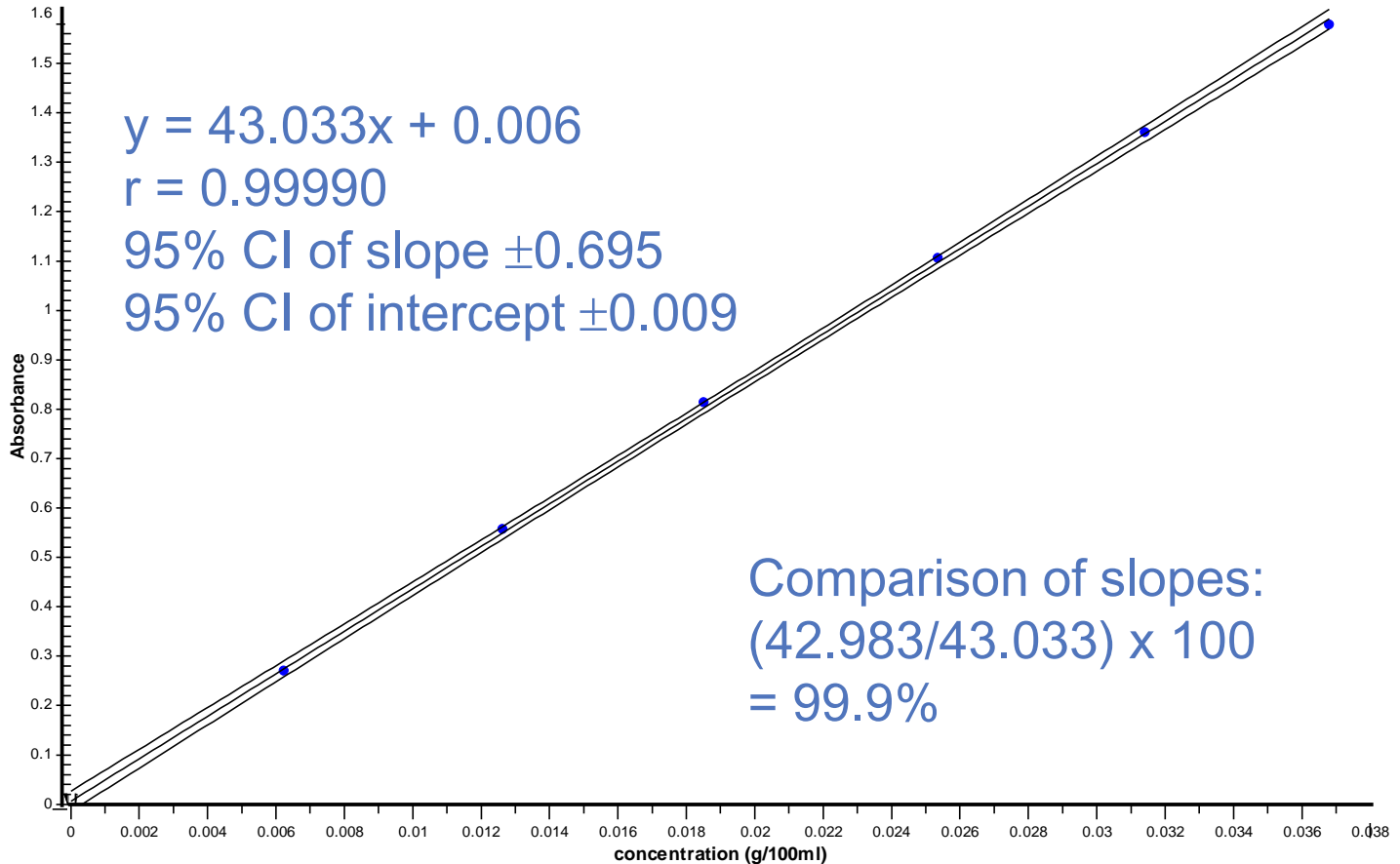


Συγκέντρωση (g/100ml)



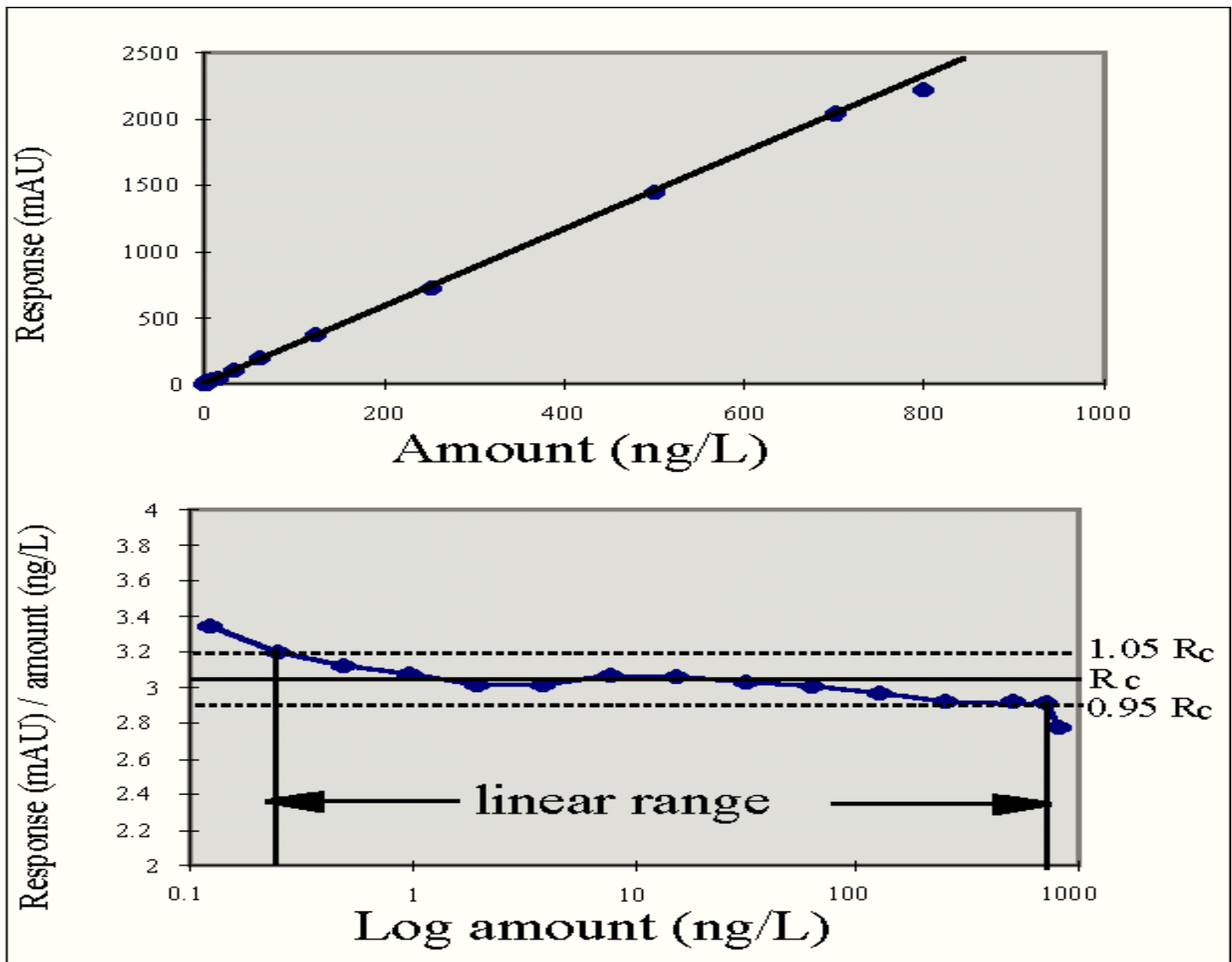
Linearity in the absence of placebo

Απορρόφηση



Συγκέντρωση (g/100ml)





Τέλος



Χρηματοδότηση

- Το παρόν εκπαιδευτικό υλικό έχει αναπτυχθεί στο πλαίσιο του εκπαιδευτικού έργου του διδάσκοντα.
- Το έργο «**Ανοικτά Ακαδημαϊκά Μαθήματα στο Πανεπιστήμιο Αθηνών**» έχει χρηματοδοτήσει μόνο την αναδιαμόρφωση του εκπαιδευτικού υλικού.
- Το έργο υλοποιείται στο πλαίσιο του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» και συγχρηματοδοτείται από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο) και από εθνικούς πόρους.



Σημειώματα

Σημείωμα Ιστορικού Εκδόσεων Έργου

Το παρόν έργο αποτελεί την έκδοση 1.0.

Έχουν προηγηθεί οι κάτωθι εκδόσεις:

- Έκδοση διαθέσιμη [εδώ](#).



Σημείωμα Αναφοράς

Copyright Εθνικών και Καποδιστριακών Πανεπιστημίων Αθηνών, Κουμπάρης Μιχαήλ 2015. Κουμπάρης Μιχαήλ. «Έλεγχος και Διασφάλιση Ποιότητας». Έκδοση: 1.0. Αθήνα 2015.

Διαθέσιμο από τη δικτυακή διεύθυνση:

<http://opencourses.uoa.gr/courses/CHEM103/>



Σημείωμα Αδειοδότησης

Το παρόν υλικό διατίθεται με τους όρους της άδειας χρήσης Creative Commons Αναφορά, Μη Εμπορική Χρήση Παρόμοια Διανομή 4.0 [1] ή μεταγενέστερη, Διεθνής Έκδοση. Εξαιρούνται τα αυτοτελή έργα τρίτων π.χ. φωτογραφίες, διαγράμματα κ.λ.π., τα οποία εμπεριέχονται σε αυτό και τα οποία αναφέρονται μαζί με τους όρους χρήσης τους στο «Σημείωμα Χρήσης Έργων Τρίτων».



[1] <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Ως **Μη Εμπορική** ορίζεται η χρήση:

- που δεν περιλαμβάνει άμεσο ή έμμεσο οικονομικό όφελος από την χρήση του έργου, για το διανομέα του έργου και αδειοδόχο
- που δεν περιλαμβάνει οικονομική συναλλαγή ως προϋπόθεση για τη χρήση ή πρόσβαση στο έργο
- που δεν προσπορίζει στο διανομέα του έργου και αδειοδόχο έμμεσο οικονομικό όφελος (π.χ. διαφημίσεις) από την προβολή του έργου σε διαδικτυακό τόπο

Ο δικαιούχος μπορεί να παρέχει στον αδειοδόχο ξεχωριστή άδεια να χρησιμοποιεί το έργο για εμπορική χρήση, εφόσον αυτό του ζητηθεί.



Διατήρηση Σημειωμάτων

Οποιαδήποτε αναπαραγωγή ή διασκευή του υλικού θα πρέπει να συμπεριλαμβάνει:

- το Σημείωμα Αναφοράς
- το Σημείωμα Αδειοδότησης
- τη δήλωση Διατήρησης Σημειωμάτων
- το Σημείωμα Χρήσης Έργων Τρίτων (εφόσον υπάρχει)

μαζί με τους συνοδευόμενους υπερσυνδέσμους.

