ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών

Έλεγχος και Διασφάλιση Ποιότητας

Ενότητα 5: Επικύρωση/Επαλήθευση αναλυτικών μεθόδων (2)

Κουππάρης Μιχαήλ

Τμήμα Χημείας

Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας

ΑΚΡΙΒΕΙΑ (ACCURACY) (1)

Αναφέρεται στη διαφορά (σφάλμα, error ή bias) μεταξύ του μέσου όρου (mean) x_{mean}, μιας σειράς μετρήσεων και της τιμής μ, η οποία γίνεται αποδεκτή ως η αληθής (true) ή ορθή (correct) τιμή της μετρούμενης ποσότητας.

Χρησιμοποιείται επίσης για τη διαφορά μεταξύ μιας τιμής x_i και της μ.

Η απόλυτη ακρίβεια του μέσου όρου δίνεται από τη διαφορά

$$X_{mean} – \mu$$

Και μιας ιδιαίτερης τιμής από τη διαφορά

$$X_i – \mu$$

Η ακρίβεια σχετίζεται με τη συμφωνία μεταξύ της μετρούμενης συγκεντρώσεως και της «αληθούς τιμής» (true value).

ΑΚΡΙΒΕΙΑ (ACCURACY) (2)

Οι κύριοι περιορισμοί στην ακρίβεια προέρχονται από:

α) Τα τυχαία σφάλματα (random errors)

β) Τα συστηματικά σφάλματα (bias) μιας αναλυτικής μεθόδου (θετική ή αρνητική απόκλιση του μέσου αναλυτικού αποτελέσματος από τη γνωστή ή θεωρούμενη αληθή τιμή).

Μια ακριβής (accurate) μέτρηση είναι αυτή που στερείται συστηματικού σφάλματος και είναι επαναλήψιμη (precise).

Η διαφορά (x_{mean} – μ) (συστηματικό σφάλμα, bias) της μεθόδου εκφράζει την ορθότητα (truness) της μεθόδου.

Σφάλμα μέτρησης = (x_i – μ) = (x_i – x_{mean}) + (x_{mean}– μ) =(τυχαίο σφάλμα) + (bias)

Ακρίβεια μέτρησης = (επαναληψιμότητα μεθόδου) +(ορθότητα μεθόδου)

ΑΚΡΙΒΕΙΑ (ACCURACY) (3)
ΟΛΙΚΟ ΣΦΑΛΜΑ (TOTAL ERROR)

$$T = \frac{|\bar{x} - \mu| + 2s}{\mu} \cdot 100\%$$

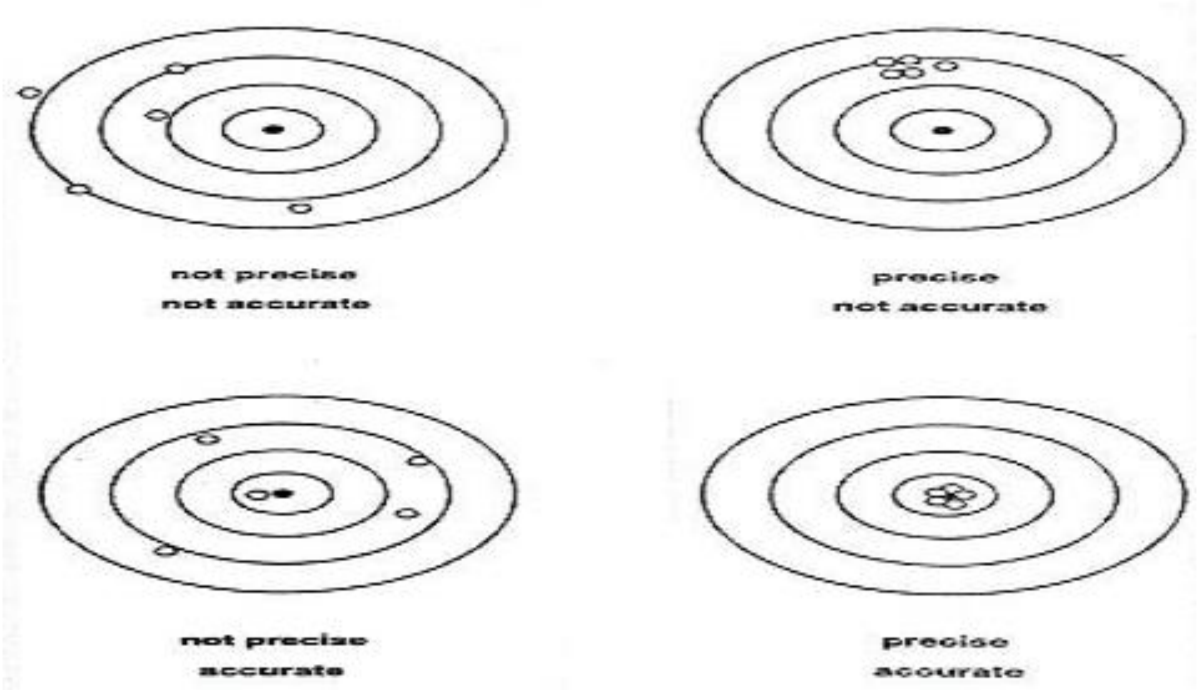
X_{mean} – μ = συστηματικό σφάλμα (bias) μέτρο ορθότητας μεθόδου

S = τυπική απόκλιση μεθόδου, μέτρο επαναληψιμότητας

Η αποδεκτή τιμή μ μπορεί να ληφθεί:

- Από υλικό αναφοράς (reference material) γνωστής ή γενικά αποδεκτής σύνθεσης
- Από ειδικά παρασκευασμένο (εμβολιασμένο, spiked) δείγμα
- Από τα αποτελέσματα μιας άλλης μεθόδου, γνωστής ακρίβειας και επαναληψιμότητας

Σχέση ακρίβειας (accuracy) και πιστότητας (precision)



ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΚΡΙΒΕΙΑΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΠΟΣΟΤΙΚΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ (ASSAY) ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΛΕΓΧΟΥ ΚΑΘΑΡΟΤΗΤΑΣ ΠΡΩΤΩΝ ΥΛΩΝ

1. Εφαρμογή της αναλυτικής μεθόδου σε δείγμα του αναλύτη γνωστής καθαρότητας (υλικό αναφοράς, reference material)(t-test)
2. Σύγκριση των αποτελεσμάτων της αξιολογούμενης μεθόδου με αυτά που λαμβάνονται από μια δεύτερη καλώς χαρακτηρισμένη (επικυρωμένη) μέθοδο, η ακρίβεια της οποίας αναφέρεται και/ή είναι καθορισμένη (ανεξάρτητη μέθοδος) (t-test).
3. Η ακρίβεια ελέγχεται συγχρόνως κατά τη συλλογή των δεδομένων της επαναληψιμότητας, γραμμικότητας και ειδικότητας.

ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΚΡΙΒΕΙΑΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΠΟΣΟΤΙΚΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ (ASSAY) ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΟΣΟΤΙΚΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ (ΣΚΕΥΑΣΜΑΤΩΝ) (1)

1. Εφαρμογή της αναλυτικής μεθόδου σε συνθετικά μείγματα των συστατικών του προϊόντος στα οποία έχουν προστεθεί γνωστές ποσότητες της προς προσδιορισμό ουσίας. Υπολογισμός σφάλματος για κάθε δείγμα. Εάν η περιοχή είναι ευρεία, κατασκευή του διαγράμματος x_i ως προς μ_i. Η τομή (intercept, a) διάφορη του μηδενός είναι μέτρο του σταθερού συστηματικού σφάλματος, η ποσότητα (b-1)x100 είναι μέτρο του σχετικού αναλογικού σφάλματος και το $S_{y/x}$ είναι μέτρο του τυχαίου σφάλματος.

ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΚΡΙΒΕΙΑΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΠΟΣΟΤΙΚΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ (ASSAY) ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΟΣΟΤΙΚΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ (ΣΚΕΥΑΣΜΑΤΩΝ) (2)

2. Προσθήκη γνωστών ποσοτήτων αναλύτη σε προϊόν και υπολογισμός της ανάκτησης:

$$\%R=[C_{spiked} / (C_o + \Delta C)] \times 100$$

3. Σύγκριση αποτελεσμάτων με αυτά που λαμβάνονται με μια δεύτερη, καλώς χαρακτηρισμένη (ανεξάρτητη) μέθοδο.

ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΚΡΙΒΕΙΑΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΠΟΣΟΤΙΚΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ (ASSAY) ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΟΣΟΤΙΚΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΠΡΟΣΜΙΞΕΩΝ (1)

- Προσδιορίζεται με εφαρμογή της μεθόδου σε δείγματα πρώτων υλών ουσιών ή προϊόντων τους, τα οποία έχουν εμβολιασθεί (spiked) με γνωστές ποσότητες των προσμείξεων.
- Εάν είναι αδύνατη η διάθεση ορισμένων προσμίξεων ή προϊόντων διασπάσεως μιας ουσίας, είναι αποδεκτή η σύγκριση με τα αποτελέσματα που λαμβάνονται με μια ανεξάρτητη μέθοδο.

ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΚΡΙΒΕΙΑΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΠΟΣΟΤΙΚΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ (ASSAY) ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΟΣΟΤΙΚΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΠΡΟΣΜΙΞΕΩΝ (2)

- Στις χρωματογραφικές μεθόδους για τον ποσοτικό προσδιορισμό των προσμίξεων μιας ουσίας μπορεί να χρησιμοποιηθεί ο παράγοντας απόκρισης (response factor) της ουσίας αυτής.
- Όταν είναι αδύνατη ή δύσκολη η Παρασκευή γνωστών λευκών δειγμάτων (placebos), μπορεί να χρησιμοποιηθεί ένα χαμηλής συγκεντρώσεως γνωστό πρότυπο.

ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΚΡΙΒΕΙΣ – ΣΥΝΙΣΤΩΜΕΝΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ (1)

- Η ακρίβεια ελέγχεται χρησιμοποιώντας τουλάχιστον 9 προσδιορισμούς, σε τρία τουλάχιστον επίπεδα που καλύπτουν την καθοριζόμενη περιοχή συγκεντρώσεων (π.χ. 3 συγκεντρώσεις x 3 προσδιορισμούς κάθε μια). Μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί σειρά 5 τουλάχιστον διαφορετικών συγκεντρώσεων του αναλύτη, κατανεμημένων περίπου ομοιόμορφα και περιλαμβάνουν το 50–150% της αναμενόμενης περιοχής εργασίας. Εάν ο έλεγχος γίνει παράλληλα με τον έλεγχο επαναληψιμότητας μπορούν να γίνουν 6 τουλάχιστον προσδιορισμοί ανά συγκέντρωση.

ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΚΡΙΒΕΙΣ – ΣΥΝΙΣΤΩΜΕΝΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ (2)

Παρουσίαση ακρίβειας:

- Ως εκατοστιαία ανάκτηση (%Recovery) της γνωστής ποσότητας του αναλύτη που προστέθηκε στο δείγμα.
- Ως η διαφορά μεταξύ του μέσου όρου των τιμών που βρέθηκαν από την εφαρμογή της ελεγχόμενης μεθόδου σε ένα δείγμα και της παραδεκτής αληθούς τιμής (accepted true value) (τιμή του δείγματος αναφοράς ή τιμή που βρέθηκε από την εφαρμογή μιας ανεξάρτητης μεθόδου) μαζί με τα όρια εμπιστοσύνης.

ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΚΡΙΒΕΙΣ – ΕΓΓΡΑΦΑ ΤΕΚΜΗΡΙΩΣΗΣ

- Για κάθε δείγμα αναγράφεται:
  - Η θεωρητική τιμή (μ) (theoretical value)
  - Η τιμή προσδιορισμού (x) (assay value)
  - Η εκατοστιαία ανάκτηση (percent recovery) (x/μ).100
- Υπολογίζεται ο μέσος όρος, η τυπική απόκλιση, η σχετική τυπική απόκλιση , και η εκατοστιαία ανάκτηση όλων των δειγμάτων
- Αναγράφονται τα αποτελέσματα στο φύλλο δεδομένων.

ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΚΡΙΒΕΙΑΣ– ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΑΠΟΔΟΧΗΣ

Για την Αμερικανική και Ευρωπαϊκή Φαρμακοποία, τα όρια είναι 98%-102% για τους ποσοτικούς προσδιορισμούς δραστικών σε φαρμακευτικά σκευάσματα.

Για προϊόντα άνευ κανονισμών ελέγχου γίνεται αποδεκτή ανάκτηση 90%-110%.

Από μερικούς προτείνεται ανεκτό σφάλμα ίσο με 4 φορές την τυπική απόκλιση.

Σε κάθε περίπτωση το Εργαστήριο πρέπει να ενημερώνεται για τα κριτήρια αποδοχής των Ευρωπαϊκών και Εθνικών φορέων.

Accuracy Data Set (1 of 3)

Amount Added (mg)	Amount Found (mg)	Percent Recovery
0.0	0.0	---
50.2	50.4	100.5
79.6	80.1	100.6
99.9	100.7	100.8
120.2	119.8	99.7
150.4	149.7	99.5

ΠΙΣΤΟΤΗΤΑ (PRECISION) (1)

Είναι το πλέον χρησιμοποιούμενο-και μερικές φορές (κακώς) το αποκλειστικό –χαρακτηριστικό ποιότητας (κριτήριο) ποιότητας μιας αναλυτικής μεθόδου.

Η πιστότητα εκφράζει την προσέγγιση της συμφωνίας μεταξύ των επαναλαμβανομένων αποτελεσμάτων της μεθόδου.

Η πιστότητα μπορεί να περιγραφεί ως η ποσότητα που μετρά τη διασπορά (dispersion) των αποτελεσμάτων όταν η αναλυτική μεθοδολογία επαναλαμβάνεται σε ένα δείγμα.

ΠΙΣΤΟΤΗΤΑ (PRECISION) (2)

Η διασπορά των αποτελεσμάτων προκαλείται από διάφορες τυχαίες πηγές και θα βρίσκεται γύρω από την αναμενόμενη τιμή του αποτελέσματος εάν δεν υπάρχει συστηματικό σφάλμα.

Στην ανάλυση θεωρείται ότι η διασπορά είναι τέτοια έτσι, ώστε να περιγράφεται ως μια τυχαία κατανομή (normal distribution ή Gaussian)

ΠΙΣΤΟΤΗΤΑ (PRECISION) (3)

Στην πράξη γίνονται περιορισμένες παρατηρήσεις (μετρήσεις) και λαμβάνονται ως εκτιμήτριες των:

- μ (αληθής τιμή): ο μέσος όρος (mean) x_{mean}
- σ (τυπική απόκλιση πληθυσμού): η τυπική απόκλιση s ή SD

Συχνά ως εκτιμήτρια της s μπορεί να ληφθεί από το εύρος (range) των μετρήσεων.

ΠΙΣΤΟΤΗΤΑ (PRECISION) (4)

Υποσύνολα της πιστότητας:

Επαναληψιμότητα (Repeatability)

Αναπαραγωγιμότητα

(Reproducibility)

ΕΠΑΝΑΛΗΨΙΜΟΤΗΤΑ – REPEATABILITY ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΜΟΤΗΤΑ – REPRODUCIBILITY (1)

Επαναληψιμότητα: Το μέτρο της διασποράς των αποτελεσμάτων διαδοχικών ελέγχων στο ίδιο δείγμα, που εκτελούνται κάτω από τις ίδιες συνθήκες, δηλ. ίδια μέθοδος ελέγχου, ίδιος αναλυτής, ίδια συσκευή, ίδιο εργαστήριο και βραχύ χρονικό διάστημα.

ΕΠΑΝΑΛΗΨΙΜΟΤΗΤΑ – REPEATABILITY ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΜΟΤΗΤΑ – REPRODUCIBILITY (2)

Αναπαραγωγιμότητα: Το μέτρο της διασποράς μεταξύ των αποτελεσμάτων που λαμβάνονται με την ίδια μέθοδο στο ίδιο δείγμα, κάτω από διαφορετικές συνθήκες, δηλ. διαφορετικός αναλυτής, διαφορετικές συσκευές, διαφορετικές παρτίδες αντιδραστηρίων, διαφορετικούς χρόνους.

- **Ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα** (στο ίδιο εργαστήριο) [στις Φαρμακοποιίες αναφέρεται και ως **IntermediatePrecision– Ενδιάμεση Πιστότητα**]
- **Διεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα** (σε διαφορετικά εργαστήρια).

ΕΠΑΝΑΛΗΨΙΜΟΤΗΤΑ – REPEATABILITY ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΜΟΤΗΤΑ – REPRODUCIBILITY (3) ΑΛΛΟΙ ΟΡΟΙ

Within run precision: Εντός προσδιορισμού επαναληψιμότητα: αναφέρεται στην επαναληψιμότητα σειράς μετρήσεων του ιδίου διαλύματος εργασίας ενός δείγματος (επομένως είναι μέτρο της διασποράς των αποτελεσμάτων του σταδίου της μέτρησης της αναλυτικής παραμέτρου).

Αναφέρεται και ως Επαναληψιμότητα Συστήματος (System Precision)

ΕΠΑΝΑΛΗΨΙΜΟΤΗΤΑ – REPEATABILITY ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΜΟΤΗΤΑ – REPRODUCIBILITY (4) ΑΛΛΟΙ ΟΡΟΙ

Between run precision: <u>Μεταξύ προσδιορισμών επαναληψιμότητα</u>: αναφέρεται σε σειρά προσδιορισμών διαφορετικών τμημάτων του ιδίου δείγματος στα οποία εφαρμόζονται όλα τα στάδια της αναλυτικής μεθόδου.

Για μεθόδους ρουτίνας που εκτελούνται σε μεγάλο αριθμό δειγμάτων, π.χ σε κλινικά εργαστήρια, είναι χρήσιμοι οι όροι:

Within a day precision: <u>Εντός της ημέρας επαναναληψιμότητα</u>

Between days precision: <u>Μεταξύ ημερών (αναπαραγωγιμότητα)</u>

ΕΠΑΝΑΛΗΨΙΜΟΤΗΤΑ – REPEATABILITY ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΜΟΤΗΤΑ – REPRODUCIBILITY (4α)

ΑΛΛΟΙ ΟΡΟΙ

Όριο επαναληψιμότητας (Repeatability Limit “r”)

Η μέγιστη απόλυτη διαφορά μεταξύ δύο αποτελεσμάτων δοκιμών με συνθήκες επαναληψιμότητας:

$$r = t_{\infty} \times \sqrt{2} \times \sigma_r$$

Όπου t_{∞} η τιμή κριτηρίου Students δύο άκρων για ν = ∞ για στάθμη εμπιστοσύνης 95%, ίση με 1,96 και σ_r η τυπική απόκλιση σε συνθήκες επαναληψιμότητας. Επομένως:

$$r = 2{,}77 \times \sigma_r$$

ΕΠΑΝΑΛΗΨΙΜΟΤΗΤΑ – REPEATABILITY ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΜΟΤΗΤΑ – REPRODUCIBILITY (4β)

ΑΛΛΟΙ ΟΡΟΙ

Όριο αναπαραγωγιμότητας (Reproducibility Limit “R”)

Η μέγιστη απόλυτη διαφορά μεταξύ δύο αποτελεσμάτων δοκιμών με συνθήκες αναπαραγωγιμότητας:

$$r = t_{\infty} \times \sqrt{2} \times \sigma_R$$

Όπου t_{∞} η τιμή κριτηρίου Students δύο άκρων για ν = ∞ για στάθμη εμπιστοσύνης 95%, ίση με 1,96 και σ_R η τυπική απόκλιση σε συνθήκες αναπαραγωγιμότητας.

Επομένως:

$$r = 2{,}77 \times \sigma_R$$

ΕΛΕΓΧΟΣ ΕΠΑΝΑΛΗΨΙΜΟΤΗΤΑΣ

- Ελέγχεται με τουλάχιστον 9 προσδιορισμούς που καλύπτουν την καθοριζόμενη περιοχή συγκεντρώσεων της μεθόδου (π.χ. 3 επίπεδα συγκεντρώσεων x 3 προσδιορισμούς κάθε μια ή τουλάχιστον 6 προσδιορισμούς στο 100% της συγκεντρώσεως ελέγχου.
- Εάν απαιτείται υπολογίζεται και η ενδιάμεση επαναληψιμότητα ή επαναληψιμότητα συστήματος.
- Εκτελείται από ένα αναλυτή, στο ίδιο όργανο, σε βραχύ χρονικό διάστημα, με την ίδια παρτίδα αντιδραστηρίων

ΕΛΕΓΧΟΣ ΕΝΔΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΜΟΤΗΤΣ (INTERMEDIATE PRECISION)

- Ελέγχεται η επίδραση τυχαίων γεγονότων στην πιστότητα της μεθόδου εντός του ιδίου εργαστηρίου.
- Τυπικές μεταβολές που μελετούνται περιλαμβάνουν:
  - Διαφορετικές ημέρες
  - Διαφορετικοί αναλυτές
  - Διαφορετικά όργανα
  - Διαφορετικές παρτίδες αντιδραστηρίων / αναλωσίμων (π.χ. στήλες χρωματογραφίας)
- Η μελέτη όλων των επιδράσεων γίνεται με πειραματικό σχεδιασμό και όχι κάθε μια χωριστά.

ΕΛΕΓΧΟΣ ΔΙΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΜΟΤΗΤΑΣ (1)

- Ελέγχεται η επίδραση τυχαίων γεγονότων στην πιστότητα της μεθόδου σε διαφορετικά εργαστήρια.
- Διεξάγεται κυρίως για προτυποποίηση (standardization) μεθόδων από επιστημονικούς φορείς προκειμένου να γίνουν αποδεκτές ως επίσημες, π.χ. Φαρμακοποιία, AOAC, κλπ.

ΕΛΕΓΧΟΣ ΔΙΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΜΟΤΗΤΑΣ (2)

- Πληροφορίες για τη διεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα λαμβάνονται από τα διεργαστηριακά προγράμματα ελέγχου ικανότητας (εξωτερικός έλεγχος ποιότητας).
- Παρέχει τις ίδιες πληροφορίες με την έννοια «robustness»(αντοχή), δηλαδή κάτω από κανονικές μεν, αλλά διαφορετικές συνθήκες.

ΣΥΝΙΣΤΩΜΕΝΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ – ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΑΠΟΔΟΧΗΣ (1)

Για κάθε τύπο πιστότητας υπολογίζονται η τυπική απόκλιση (s ή SD), η σχετική τυπική απόκλιση (s_r ή RSD) και το διάστημα εμπιστοσύνης. Αναγράφονται τα αποτελέσματα στο φύλλο δεδομένων τεκμηρίωσης. Τα μέτρα πιστότητας σχετίζονται και χρησιμοποιούνται στον υπολογισμό της αβεβαιότητας (uncertainty) και το διάστημα εμπιστοσύνης.

ΣΥΝΙΣΤΩΜΕΝΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ – ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΑΠΟΔΟΧΗΣ (2)

Για την <u>επαναληψιμότητα της μεθόδου</u>:

Παρασκευάζεται αντιπροσωπευτικό συνθετικό δείγμα χρησιμοποιώντας το μητρικό υλικό στο οποίο θα εφαρμοσθεί η μέθοδος.

Η ποσότητα του δείγματος αντιστοιχεί τουλάχιστον στο 20πλασιο της ποσότητας για ένα προσδιορισμό. Χρησιμοποιείται η μεσαία συγκέντρωση της αναμενόμενης περιοχής εργασίας.

Γίνονται 6-7 μετρήσεις (προσδιορισμοί).

ΣΥΝΙΣΤΩΜΕΝΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ – ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΑΠΟΔΟΧΗΣ (3)

Κριτήρια αποδοχής (διάφορες επιλογές):

1. Σχετική τυπική απόκλιση μικρότερη 2%
2. Σχετική τυπική απόκλιση μικρότερη τιμών από πίνακες ανάλογα με την περιοχή συγκεντρώσεων.
3. Ρεαλιστικές σχετικές τυπικές αποκλίσεις βασισμένες στις ανάγκες της μεθόδου και/ή των κανονισμών.

ΣΥΝΙΣΤΩΜΕΝΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ – ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΑΠΟΔΟΧΗΣ (4)

- Καναδικό CHPB καθορίζει RSD για χρωματογραφικές μεθόδους:
  - μικρότερη 1,5% για φαρμακευτικές ουσίες
  - 2,5% για φαρμακευτικά σκευάσματα
- Επαναληψιμότητα συστήματος
- Διάλυμα προτύπου με τη μεσαία συγκέντρωση της αναμενόμενης περιοχής εργασίας, μετρείται τουλάχιστον 6 φορές. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί και το διάλυμα εργασίας του μεσαίου προτύπου δείγματος που χρησιμοποιήθηκε στον έλεγχο επαναληψιμότητα της μεθόδου. Εναλλακτικά μπορεί να χρησιμοποιηθεί ένα δείγμα ενδιάμεσης συγκέντρωσης.

ΣΥΝΙΣΤΩΜΕΝΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ – ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΑΠΟΔΟΧΗΣ (5)

- Κριτήρια αποδοχής RSD(για χρωματογραφικές μεθόδους, Καναδικό CHPB):
  - 1% για φαρμακευτικές ουσίες
  - 2% η για φαρμακευτικά σκευάσματα
  - 5% για μικρές συγκεντρώσεις
  - μέχρι και 10% κοντά στο όριο ποσοτικοποίησης

ΣΥΝΙΣΤΩΜΕΝΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ – ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΑΠΟΔΟΧΗΣ (6)

Ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα:

- Παρασκευάζεται σειρά διαφορετικών συγκεντρώσεων δειγμάτων που κατανέμονται ομοιόμορφα στην αναμενόμενη περιοχή συγκεντρώσεων της μεθόδου, σε ποσότητα τουλάχιστον 10-πλάσια της απαιτούμενης για ένα προσδιορισμό.
- Αναλύονται από διαφορετικούς αναλυτές, σε διαφορετικές μέρες, με διαφορετικά όργανα (εάν είναι δυνατόν) και με διαφορετικές παρτίδες αντιδραστηρίων/αναλωσίμων.

Repeatability & Intermediate Precision

Day 1	Day 2
100.6	99.5
100.8	99.9
100.1	98.9
100.3	99.2
100.5	99.7
100.4	99.6
Mean=100.5	Mean=99.5
RSD=0.24%	RSD=0.36%
Grand	
Mean=100.0	
RSD=0.59%	

Intermediate precision – Japanese style

Expt No	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**
Operator	1	1	1	1	2	2	2	2
GC	1	2	2	1	1	2	2	1
Column	1	2	1	2	1	2	1	2

Experiments are concluded on deferent days with each analyst using each instrument/column combination in turn

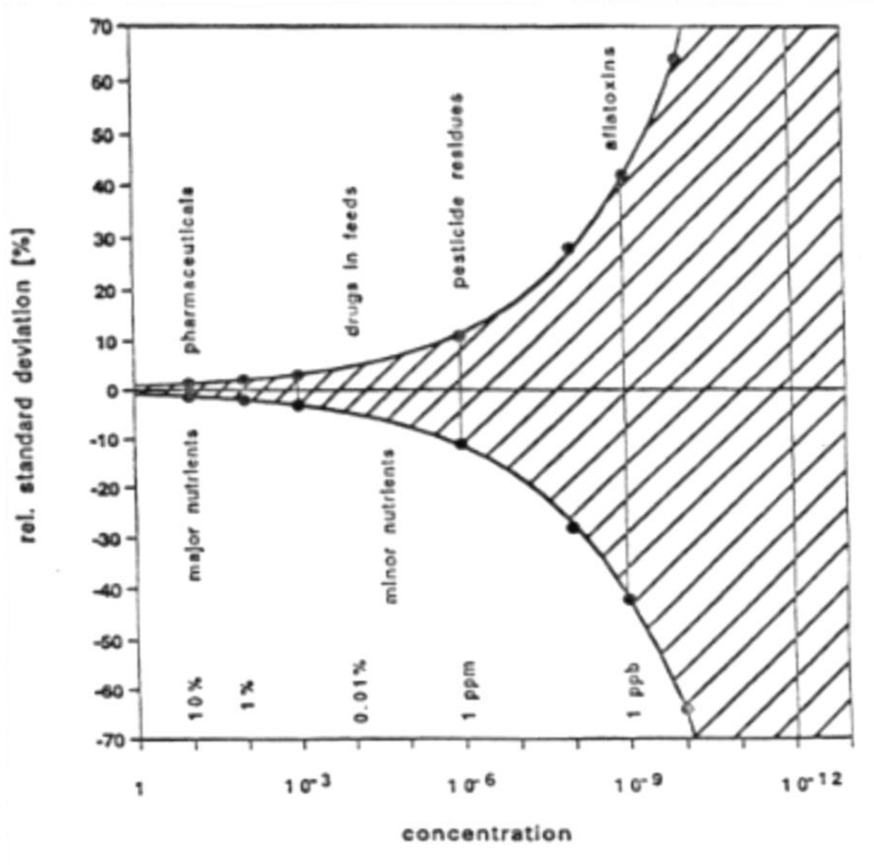
Report results: overall mean, overall standard and relative standard deviation and 95% CI of sd

Reproducibility

- Definition: Ability reproduce data within predefined precision
- Determination: SD, RSD and confidence interval
  - Repeatability test at two different labs

Lab 1		Lab 2		Lab 3	
Day 1 Man 1 3 Prep	Day 2 Man 2 3 Prep	Day 1 Man 1 3 Prep	Day 2 Man 2 3 Prep	Day 1 Man 1 3 Prep	Day 2 Man 2 3 Prep

ΕΞΙΣΩΣΗ HORWITZ ΓΙΑ ΔΙΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΜΟΤΗΤΑ ΑΝΑΛΥΤΙΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ



RSD=CV=$2^{(1\text{-}0,5 \log C)}$, όπου C υπό μορφή δυνάμεως 10, π.χ συγκέντρωση 1 mg/g γράφεται ως 10^{-3}

Χρήση Horwitz Ratio (HorRat) ως χρήσιμου δείκτη αξιολόγησης πιστότητας αναλυτικών μεθόδων (1)

- Horwitz Ratio (HorRat): Λόγος της παρατηρούμενης $\%RSD_R$ (αναπαραγωγιμότητας) των εργαστηρίων προς την προβλεπόμενη από την εξίσωση Horwitz ($\%RSD_R$)
- HoRat ≤ 0,5:
  - τεκμηριώνει εξαιρετική πιστότητα της μεθόδου στο Εργαστήριο (εκπαίδευση, εμπειρία),
- HoRat ≥ 2 αποδεικνύει μη αποδεκτή πιστότητα:
  - ανομοιογένεια δείγματος
  - ανάγκη για περαιτέρω βελτιστοποίηση της μεθόδου ή εκπαίδευση,
  - λειτουργία κάτω από το όριο ποσοτικοποίησης
  - μη αποδεκτή μέθοδο)

Άλλες Μορφές Σχέσεως Horwitz

- $\%RSD_R = 2^{(1-0,5\log C)}$, όπου C = mass fraction
- $\%RSD_R = 2C^{-0.15}$
- $SD_R = 0,02C^{0,8495}$
  - και $\%RSD_R=(SD/C)x100$
- Προτεινόμενες σχέσεις, ανάλογα με C (Analyst 125, 385, 2000)
  - $SD_R=0,22C$ εάν $C < 1,2x10^{-7}$
  - $SD_R = 0,02C^{0,8495}$ εάν $1,2x10^{-7} \leq C \leq 0,138$
  - $SD_R = 0,01C^{0,5}$ εάν $C>0,138$

Παραδείγματα %RSD_H

Concentration, C	Mass fraction, C	%RSD_H
100%	1.0	2
1%	0.01	4
0.01%	0.0001 ($1x10^{-4}$)	8
1 ppm	$1x10^{-6}$	16
10 ppm	$1x10^{-8}$	32
1 ppb	$1x10^{-9}$	45

Χρήση Horwitz Ratio (HorRat) ως χρήσιμου δείκτη αξιολόγησης πιστότητας αναλυτικών μεθόδων (2)

- Εκτός από την $\%RSD_R$ μπορεί να αξιολογηθεί και η $\%RSD_r$ (επαναληψιμότητα εργαστηρίου) κάνοντας χρήση της παραδοχής

$$\%RSD_r = 0,66\ \%RSD$$

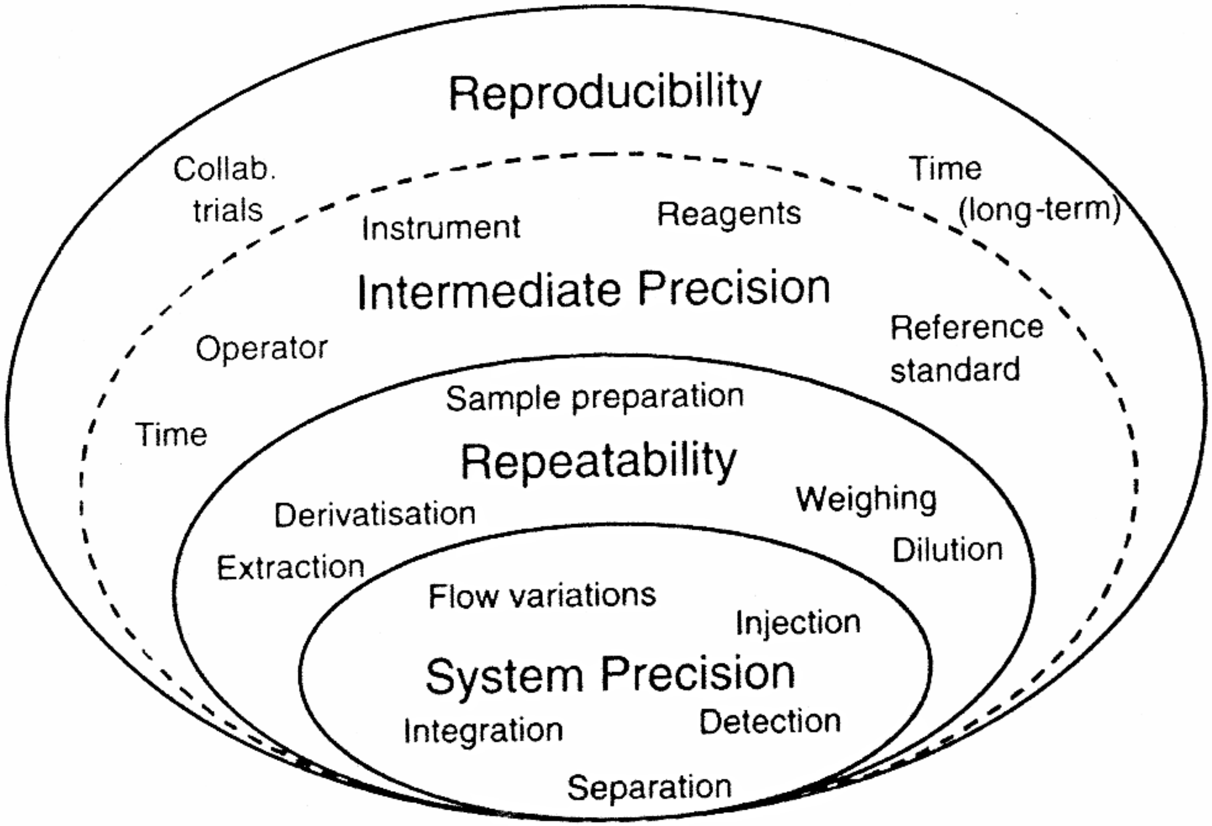
$$\%RSD_R = 1,52\ \%RSD_r$$

- Ο δείκτης HorRat είναι αποδεκτό κριτήριο από AOAC, Ευρωπαϊκή Ένωση,κλπ.

Typical expected results for Analyte concentration vs. Precision
(The AOAC manual for the Peer-Verified Methods program)

Analyte Conc (%)	Analyte Ratio	Unit	RSD%
100	1	100%	1.3
10	10^{-1}	10%	2.8
1	10^{-2}	1 %	2.7
0.1	10^{-3}	0.1%	3.7
0.01	10^{-4}	100 ppm	5.3
0.001	10^{-5}	10 ppm	7.3
0.0001	10^{-6}	1 ppm	11
0.00001	10^{-7}	100 ppb	15
0.000001	10^{-8}	10 ppb	21
0.0000001	10^{-9}	1 ppb	30

ΕΠΙΠΕΔΑ ΠΙΣΤΟΤΗΤΑΣ – ΣΥΝΕΙΣΦΕΡΟΝΤΕΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ



ΔΙΑΔΟΣΗ ΣΦΑΛΜΑΤΩΝ

$$\frac{\Delta R}{R} = \frac{\Delta M}{M} + \frac{\Delta V}{V}$$

$$\frac{\Delta R}{R} = \frac{\Delta M}{M} + \frac{\Delta V}{V} + \frac{\Delta I}{I}$$

$$\frac{\Delta R}{R} = \frac{\Delta M}{M} + \frac{\Delta V}{V} + \frac{\Delta I}{I} + \frac{\Delta A}{A}$$

ΑΝΙΧΝΕΥΣΙΜΟΤΗΤΑ (DETECTABILITY) (1)

Εκφράζει την ικανότητα της μεθόδου να ανιχνεύει / ποσοτικοποιεί χαμηλές συγκεντρώσεις του αναλύτη.

Η ικανότητα αυτή ποσοτικοιείται με δύο εκφράσεις:

α) **Όριο ανιχνεύσεως (Detection Limit, DL ή LOD)**

β) **Όριο ποσοτικοποίησης (Quantitation Limit, QL ή LOQ)**

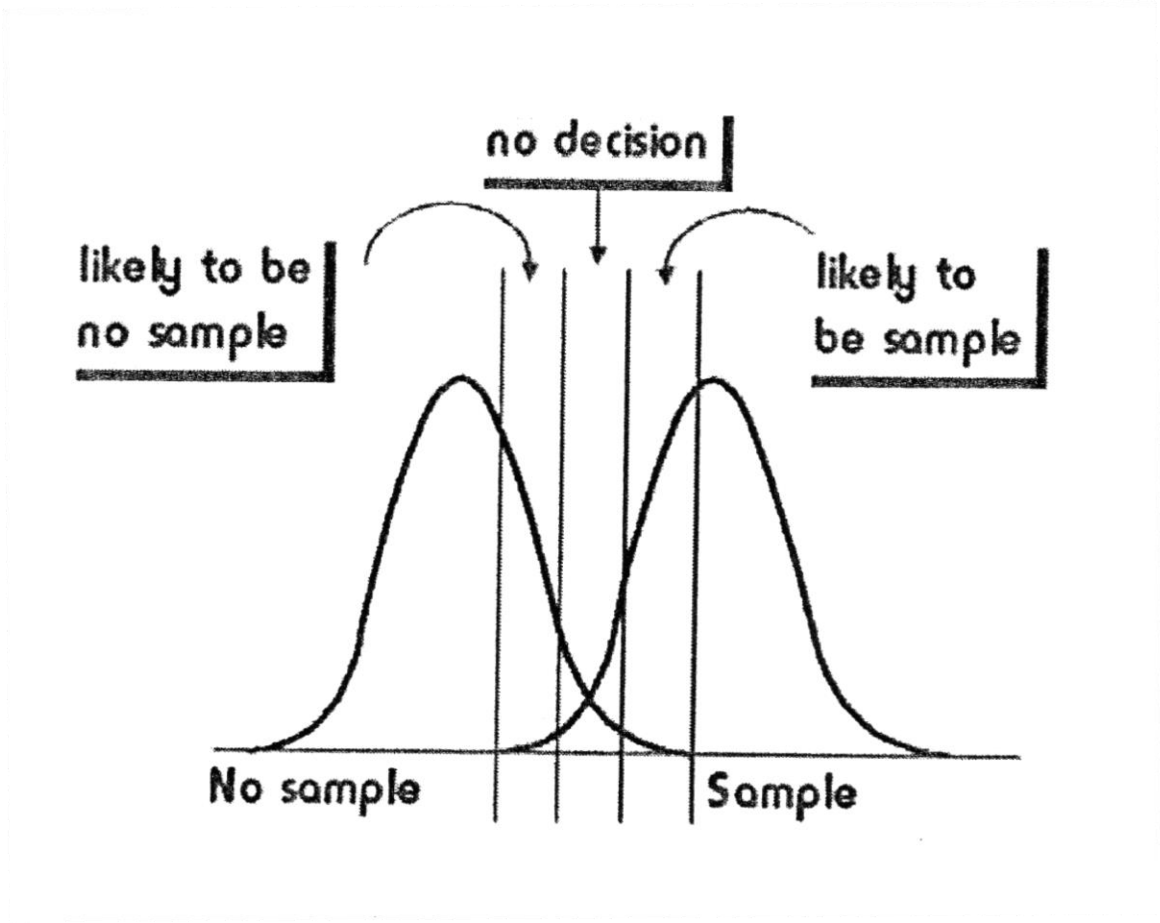
Ο ορισμός αυτών των ορίων βασίζεται στην ικανότητα της μεθόδου να διακρίνει το σήμα του αναλύτη από το σήμα του υποβάθρου ή θορύβου και τα επιτρεπόμενα σφάλματα πρώτου και δευτέρου είδους.

ΑΝΙΧΝΕΥΣΙΜΟΤΗΤΑ (DETECTABILITY) (2)

Η περιοχή των σημάτων / συγκεντρώσεων χωρίζεται σε τρεις περιοχές:

1. Περιοχή στην οποία η ανίχνευση του αναλύτη δεν είναι δυνατή (θόρυβος)
2. Περιοχή στην οποία η ανίχνευση του αναλύτη είναι αξιόπιστη και το σήμα του αναλύτη διακρίνεται από το θόρυβο.
3. Περιοχή στην οποία η ποσοτικοποίηση του αναλύτη είναι αξιόπιστη (ξεκάθαρη διάκριση σήματος αναλύτη από θόρυβο).

ΑΠΟΦΑΣΗ ΜΕΤΡΗΣΕΩΝ (MEASUREMENT DECISION)



ΑΝΙΧΝΕΥΣΙΜΟΤΗΤΑ (DETECTABILITY) (3)

Κατά την εκτίμηση παρουσίας ή μη αναλύτη (απόφαση εάν το μετρούμενο σήμα προέρχεται από αναλύτη) μπορούν να γίνουν δύο ειδών σφάλματα:

- **Σφάλμα πρώτου είδους:** Να αποφασισθεί ότι υπάρχει αναλύτης χωρίς να υπάρχει.
- **Σφάλμα δευτέρου είδους:** Να αποφασισθεί ότι δεν υπάρχει αναλύτης ενώ υπάρχει.

ΑΝΙΧΝΕΥΣΙΜΟΤΗΤΑ (DETECTABILITY) (4)

Στατιστικός Ορισμός: Όριο ανιχνεύσεως είναι το ελάχιστο παρατηρούμενο σήμα (x), το οποίο με αξιοπιστία (1-α) μπορεί να θεωρηθεί ότι είναι σήμα προκαλούμενο από τον αναλύτη. Το (α) είναι η πιθανότητα σφάλματος πρώτου είδους.

- Για τη μείωση του σφάλματος πρώτου είδους σε ανεκτό επίπεδο πρέπει να τεθεί μια απόσταση ασφαλείας μεταξύ του σήματος υποβάθρου (θορύβου) και του σήματος αναλύτη.

ΑΝΙΧΝΕΥΣΙΜΟΤΗΤΑ (DETECTABILITY) (5)

Νέος Ορισμός Ορίου Ανιχνεύσεως x:

$x = x_o + k\sigma_o$

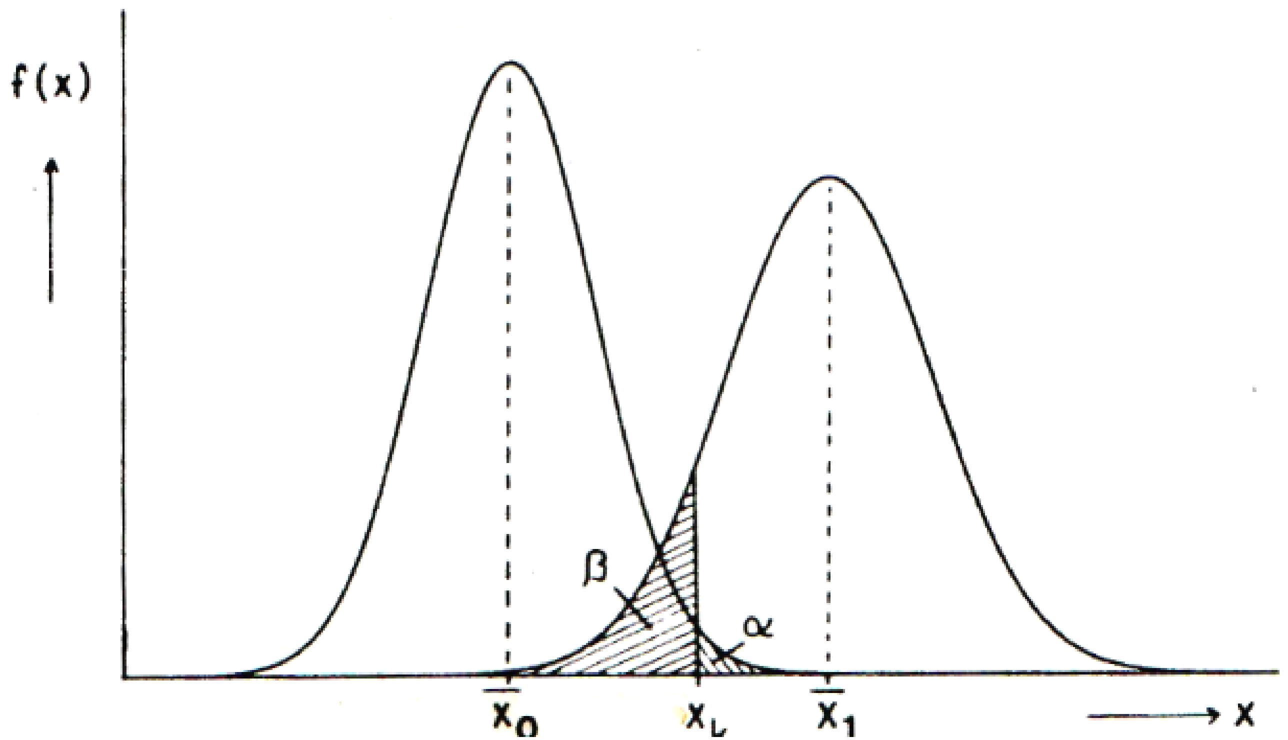
Όπου

- x_o = μέσος όρος σημάτων του λευκού δείγματος (blank) (σήμα υποβάθρου / θόρυβος)
- σ_o = τυπική απόκλιση σημάτων λευκού δείγματος
- k= παράγοντας για επιθυμητή τιμή 1-α (πιθανότητα σφάλματος πρώτου είδους)

Η συγκέντρωση $C = [\, x_o + k\sigma_o] / S$

όπου S η κλίση της καμπύλης απόκρισης (ευαισθησία της μεθόδου) αντιστοιχεί στο **Όριο Ανιχνεύσεως της Μεθόδου.**

ΕΝΝΟΙΑ ΟΡΙΟΥ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ



- X_o = Μέσο σήμα λευκού δείγματος, X_1 = Μέσο σήμα δείγματος, $X_κ$ = τιμή κριτηρίου, α= πιθανότητα ότι το σήμα του λευκού θεωρείται ως σήμα αναλύτη, β=πιθανότητα ότι το σήμα του δείγματος θεωρείται ως σήμα λευκού δείγματος

ΑΝΙΧΝΕΥΣΙΜΟΤΗΤΑ (DETECTABILITY) (6)

α	0,500	0,1587	0,0228	0,0062	0,0026	0,0013	0,0005
k	0	1,0	2,0	2,5	2,8	3,0	3,3

ΑΝΙΧΝΕΥΣΙΜΟΤΗΤΑ (DETECTABILITY) (7)

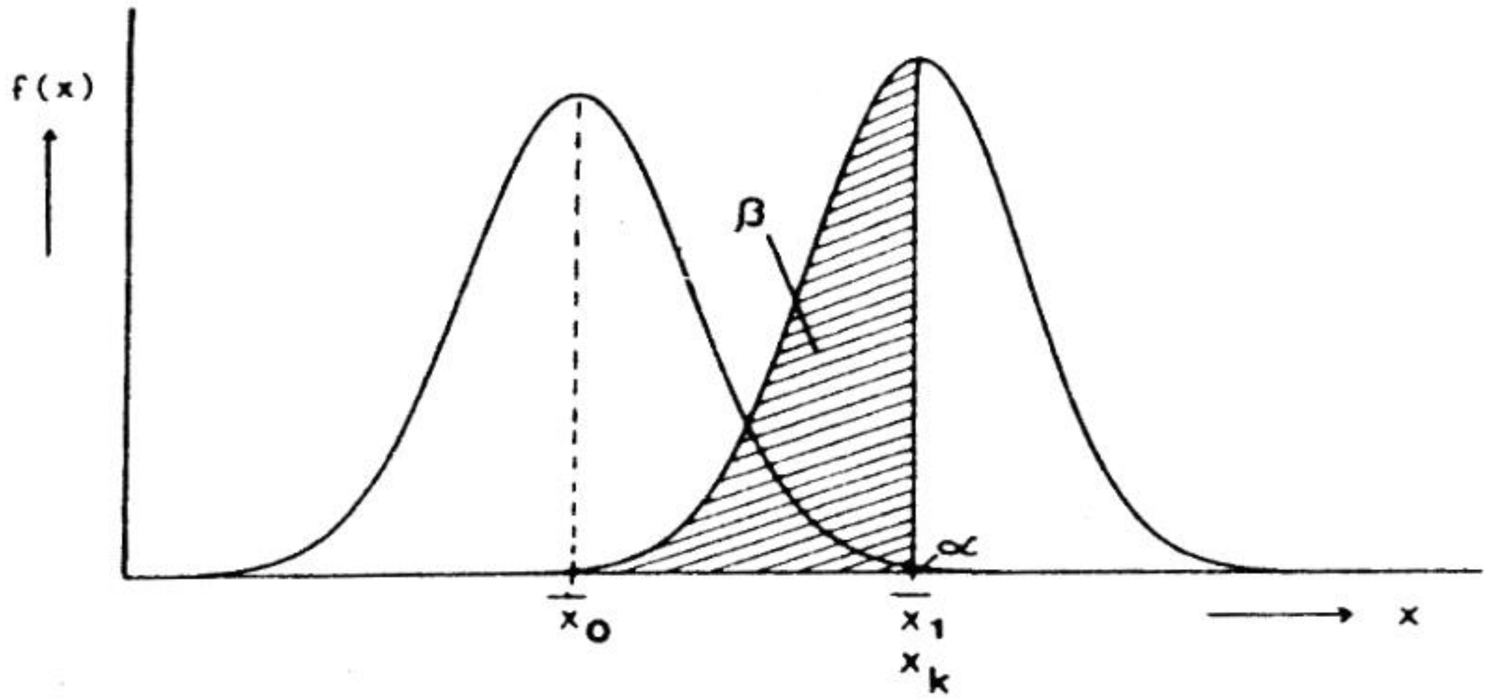
Για k = 3,3 προκύπτει ότι α = 0,0005 δηλαδή μόνο 0,05% πιθανότητα σφάλματος πρώτου είδους

Τελικοί ορισμοί:

Όριο ανιχνεύσεως: Η συγκέντρωση του αναλύτη της οποίας το αναλυτικό σήμα διαφέρει από το σήμα του λευκού δείγματος κατά 3,3 φορές την τυπική απόκλιση του σήματος του λευκού.

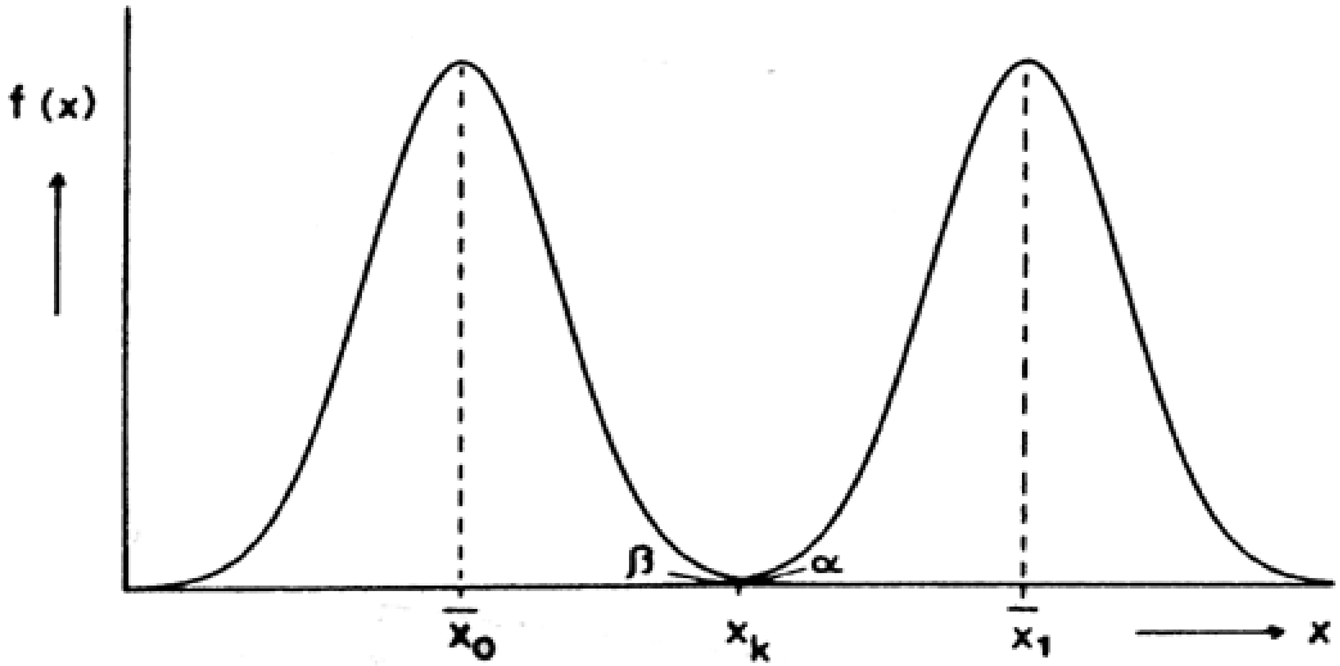
Όριο ποσοτικοποίησης : Η συγκέντρωση του αναλύτη της οποίας το αναλυτικό σήμα διαφέρει από το σήμα του λευκού δείγματος κατά 10 φορές την τυπική απόκλιση του σήματος του λευκού.

ΟΡΙΣΜΟΣ ΟΡΙΟΥ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ



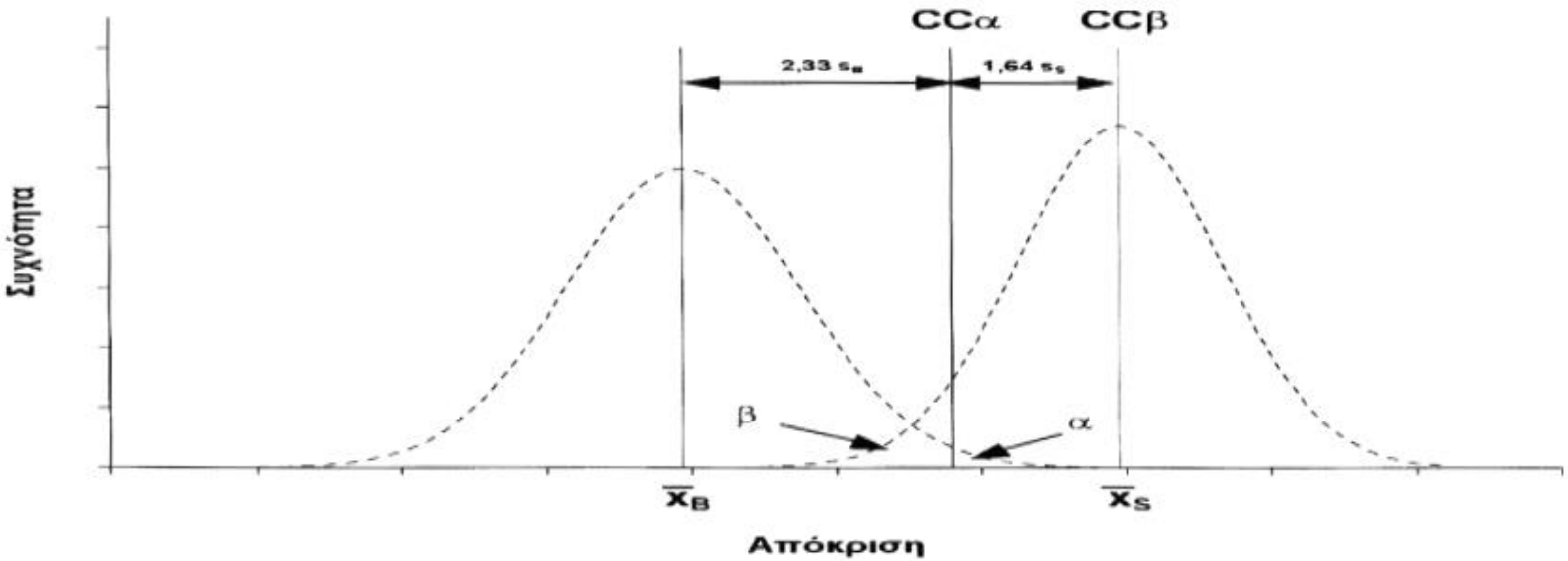
Όριο ανίχνευσης για κ = 3.Η πιθανότητα β να εκληφθεί σήμα από τον αναλύτη ότι προέρχεται από το λευκό δείγμα είναι 50%.

ΟΡΙΣΜΟΣ ΟΡΙΟΥ ΕΓΓΥΗΜΕΝΗΣ ΚΑΘΑΡΟΤΗΤΑΣ



Όριο Εγγυημένης Καθαρότητας, k = 6

ΑΝΑΛΥΤΙΚΑ ΟΡΙΑ ΓΙΑ ΥΠΟΛΛΕΙΜΑΤΑ ΟΥΣΙΩΝ ΠΟΥ ΔΕΝ ΕΧΕΙ ΚΑΘΟΡΙΣΘΕΙ ΕΠΙΤΡΕΠΟΜΕΝΟ ΟΡΙΟ



$\bar{x}_s$	μέση τιμή απόκρισης του μολυσμένου δείγματος
S_b	τυπική απόκλιση του τυφλού δείγματος (προσδιορισμένη υπό συνθήκες ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας)
S_s	τυπική απόκλιση του μολυσμένου δείγματος (προσδιορισμένη υπό ενδοεργαστηριακές συνθήκες αναπαραγωγιμότητας)
α	ποσοστό ψευδώς μη συμμορφούμενων αποτελεσμάτων
β	ποσοστό ψευδώς συμμορφούμενων αποτελεσμάτων
CCα	απόκριση με δεδομένο σφάλμα α και 50% σφάλμα β
CCβ	απόκριση με πολύ μικρό σφάλμα α και δεδομένο σφάλμα β

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΟΡΙΩΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΕΩΣ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗΣ (1α)

Χρησιμοποιούνται διάφορες προσεγγίσεις, ανάλογα εάν η αναλυτική μέθοδος είναι ενόργανη ή όχι.

- Με βάση οπτική αξιολόγηση (visual evaluation):

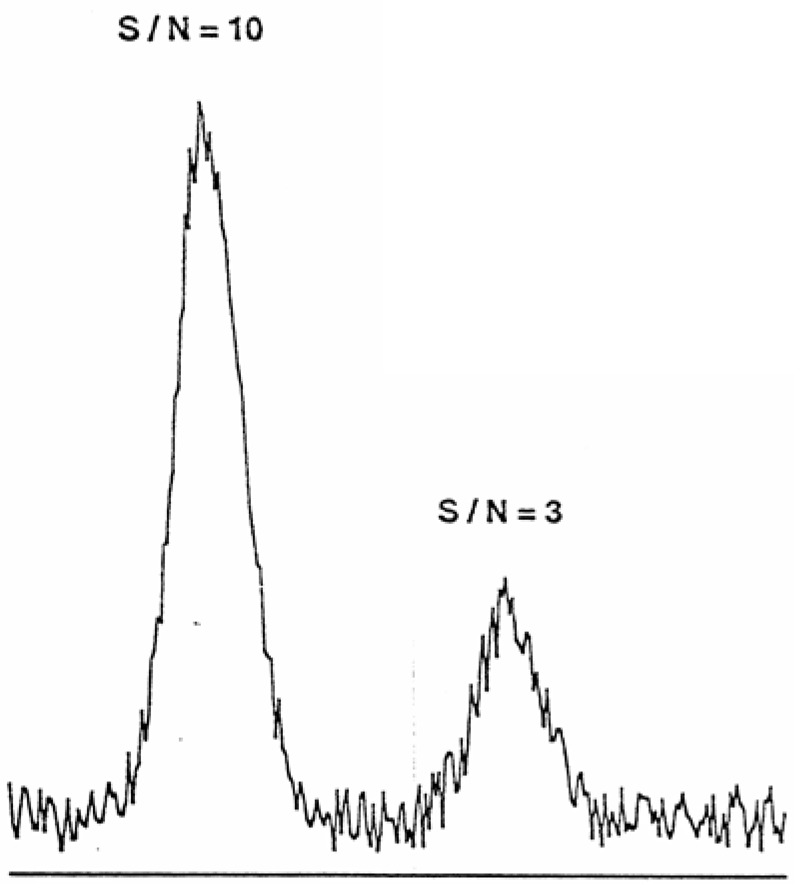
Για μη ενόργανες μεθόδους αναλύσεως. Αναλύονται δείγματα γνωστών συγκεντρώσεων του αναλύτη και καθορίζεται το επίπεδο συγκέντρωσης , στο οποίο ο αναλύτης ανιχνεύεται αξιόπιστα.

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΟΡΙΩΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΕΩΣ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗΣ (1β)

Με βάση το λόγο σήμα προς θόρυβο (signal to noise ratio, S/N):

Εφαρμόζεται μόνο σε αναλυτικές μεθόδους που παρουσιάζουν θόρυβο γραμμής βάσης (baseline noise). Γίνεται σύγκριση των σημάτων λευκού δείγματος (θόρυβος) και δειγμάτων με γνωστές χαμηλές συγκεντρώσεις. Για λόγο S/N = 3,3 ή 3 (δηλώνεται) αντιστοιχεί το LOD και για λόγο S/N= 10 το LOQ.

ΘΟΡΥΒΟΣ – ΟΡΙΟ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗΣ



ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΟΡΙΩΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΕΩΣ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗΣ (2)

Με βάση την τυπική απόκλιση (SD) της αναλυτικής απόκρισης (response) και την κλίση (slope) (b) της καμπύλης απόκρισης:

LOD = [3,3 x SD] / b

LOQ = [10 X SD]/b

Η κλίση μπορεί να υπολογισθεί από καμπύλη αναφοράς του αναλύτη (στις χαμηλές συγκεντρώσεις)

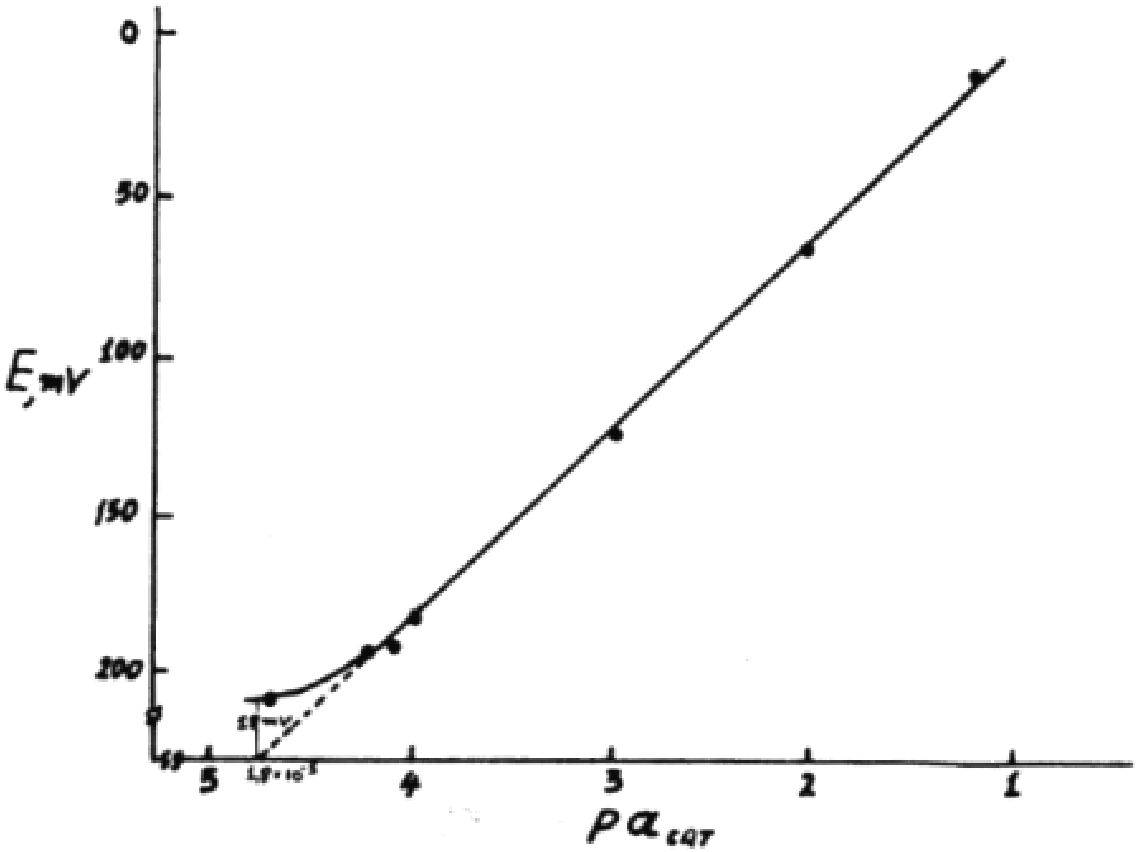
Η εκτιμήτρια της SD της απόκρισης μπορεί να εξαχθεί με διάφορους τρόπους:

1. Τυπική απόκλιση του λευκού δείγματος (blank)
2. Τυπική απόκλιση ενός αγνώστου δείγματος χαμηλής συγκέντρωσης (κοντά στο μηδέν).

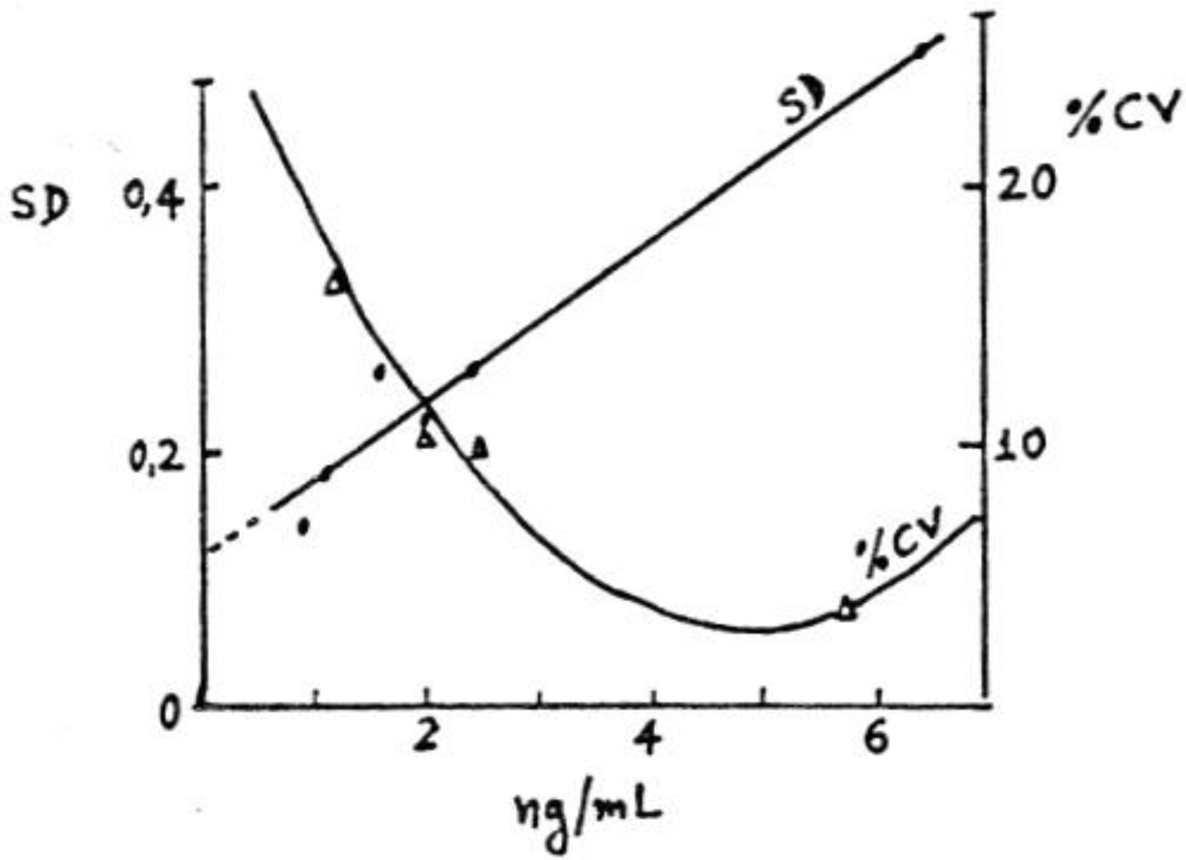
ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΟΡΙΩΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΕΩΣ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗΣ (3)

3. Ανάλυση σειράς αγνώστων ή συνθετικών προτύπων, κατασκευή του διαγράμματος SD ως προς συγκέντρωση (συνήθως γραμμική σχέση) και υπολογισμός της τομής (SD μηδενικού προτύπου) με προέκταση.
4. Από την τυπική απόκλιση της τομής α (S_a) καμπύλης αναφοράς (χαμηλές συγκεντρώσεις), για προκαταρκτικό υπολογισμό, απαιτεί επιβεβαίωση.
5. Από την τυπική απόκλιση των υπολοίπων ($S_{y/x}$) καμπύλης αναφοράς (χαμηλές συγκεντρώσεις), για προκαταρκτικό υπολογισμό, απαιτεί επιβεβαίωση.

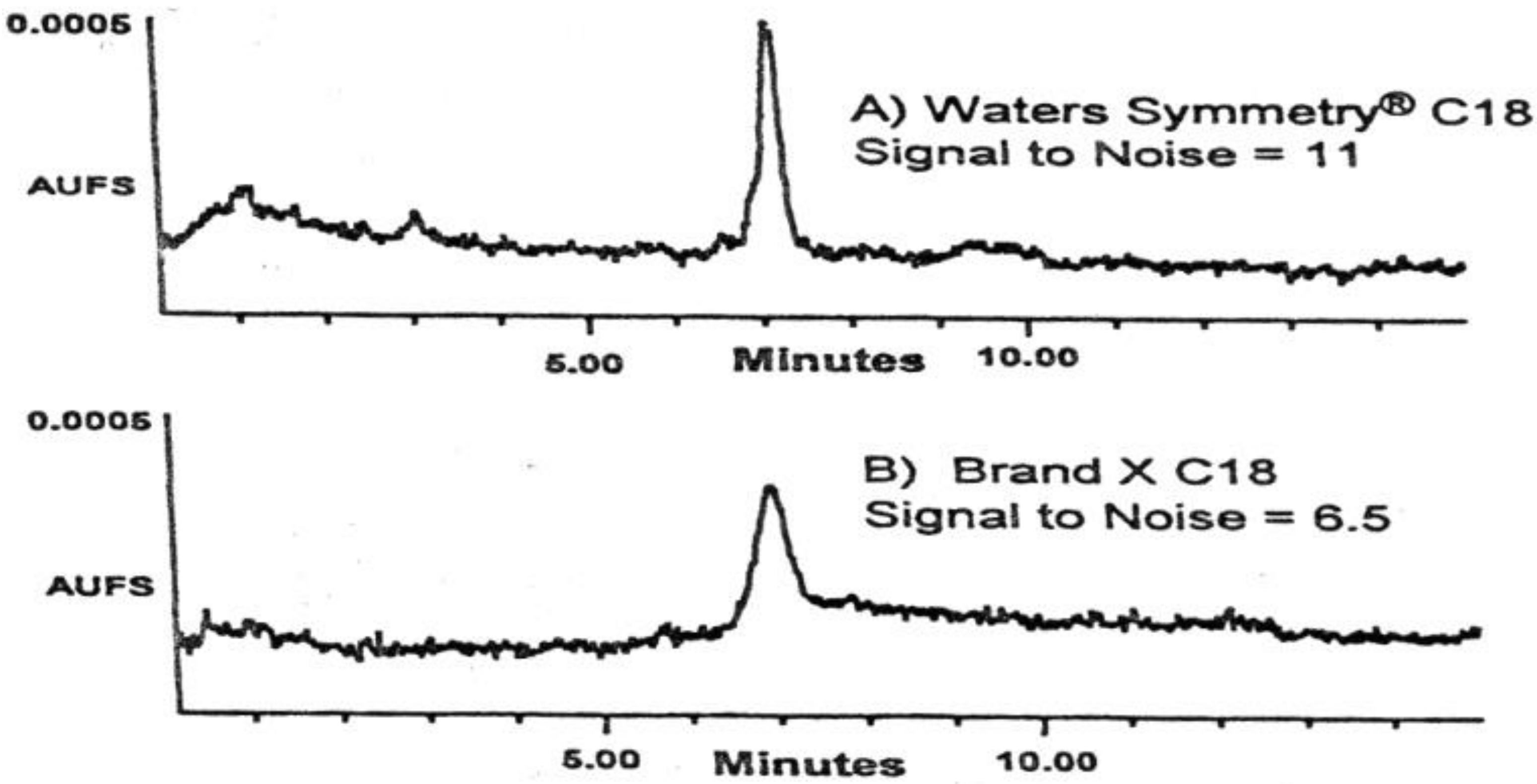
ΟΡΙΟ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΠΟΤΕΝΣΙΟΜΕΤΡΙΑΣ ΕΚΛΕΚΤΙΚΩΝ ΗΛΕΚΤΡΟΔΙΩΝ ΙΟΝΤΩΝ



ΟΡΙΟ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΑΝΟΣΟΧΗΜΙΚΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ



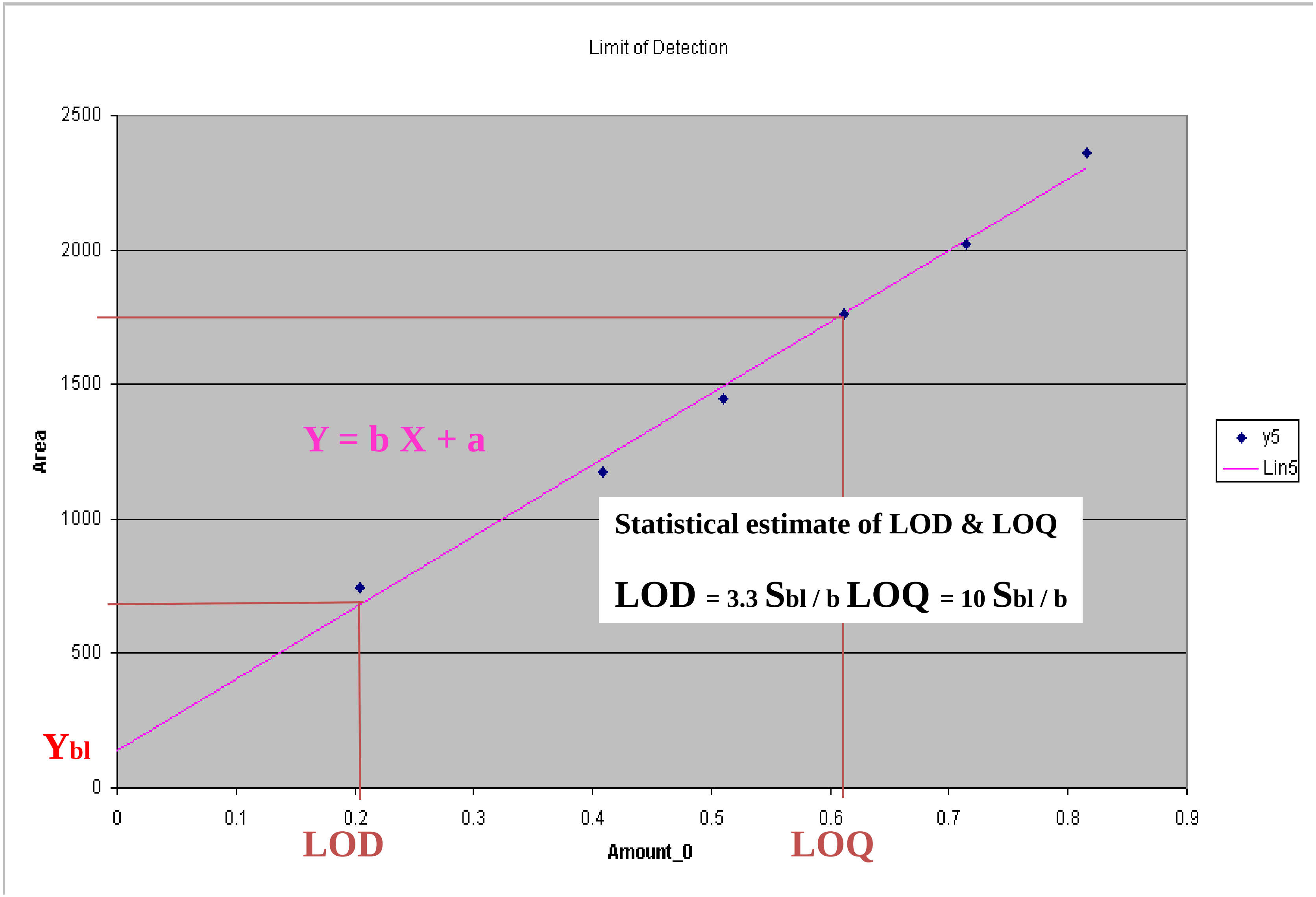
ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΣΧΗΜΑΤΟΣ ΚΟΡΥΦΗΣ HPLC ΣΕ LOD/LOQ



ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΟΡΙΩΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΕΩΣ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗΣ (4)
ΣΥΝΙΣΤΩΜΕΝΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

Παρουσιάζονται το όριο ανίχνευσης, το όριο ποσοτικοποίησης και η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε.

Σε περιπτώσεις που τα όρια προέκυψαν από υπολογισμό ή προέκταση, αυτά είναι προκαταρκτικά και πρέπει να επιβεβαιώνονται με αναλύσεις συνθετικών δειγμάτων στην περιοχή του υπολογισθέντος ορίου.


Limit of Detection
2500
2000
1500
1000
500
0
Area
0
0.1
0.2
0.3
0.4
0.5
0.6
0.7
0.8
0.9
Amount_0
y5
Lin5
Y = b X + a
Ybl
LOD
LOQ
Statistical estimate of LOD & LOQ
LOD = 3.3 Sbl / b LOQ = 10 Sbl / b

ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ (Ruggedness) (1) (για τη φαρμακοποιία ROBUSTNESS)

Εξετάζεται στη φάση της ανάπτυξης της μεθόδου και περιγράφει την ανθεκτικότητά της σε προσχεδιασμένες σκοπούμενες μικρομεταβολές των πειραματικών παραμέτρων.

Σχετίζεται με την αντοχή (robustness) της μεθόδου σε τυχαίες μη σκοπούμενες μικρομεταβολές των πειραματικών παραμέτρων που αντιστοιχούν στον έλεγχο της διεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας

ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ (Ruggedness) (2) (για τη φαρμακοποιία ROBUSTNESS)

Γίνεται πειραματικός σχεδιασμός για να μελετηθούν διάφορες μεταβολές των πειραματικών παραμέτρων και εντοπίζονται ποιες από αυτές επηρεάζουν τη μέθοδο ώστε να τεθούν αυστηρές ανοχές και μέτρα ελέγχου τους.

Από τα αποτελέσματα της ανθεκτικότητας θα διαμορφωθούν και οι έλεγχοι καταλληλότητας συστήματος για να εξασφαλισθεί η αξιοπιστία της μεθόδου κατά την εφαρμογή της.

ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ (Ruggedness) (3)

<u>Τυπικές μεταβολές παραμέτρων:</u>

- Σταθερότητα αναλυτικών διαλυμάτων
- Διαφορετικά όργανα
- Διαφορετικοί αναλυτές

ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ (Ruggedness) (4)

Περίπτωση HPLC:

- Επίδραση μεταβολών pH κινητής φάσης
- Επίδραση μεταβολών σύστασης κινητής φάσης
- Διαφορετικές στήλες (παρτίδες ή/και προμηθευτής)
- Θερμοκρασία
- Ταχύτητα ροής

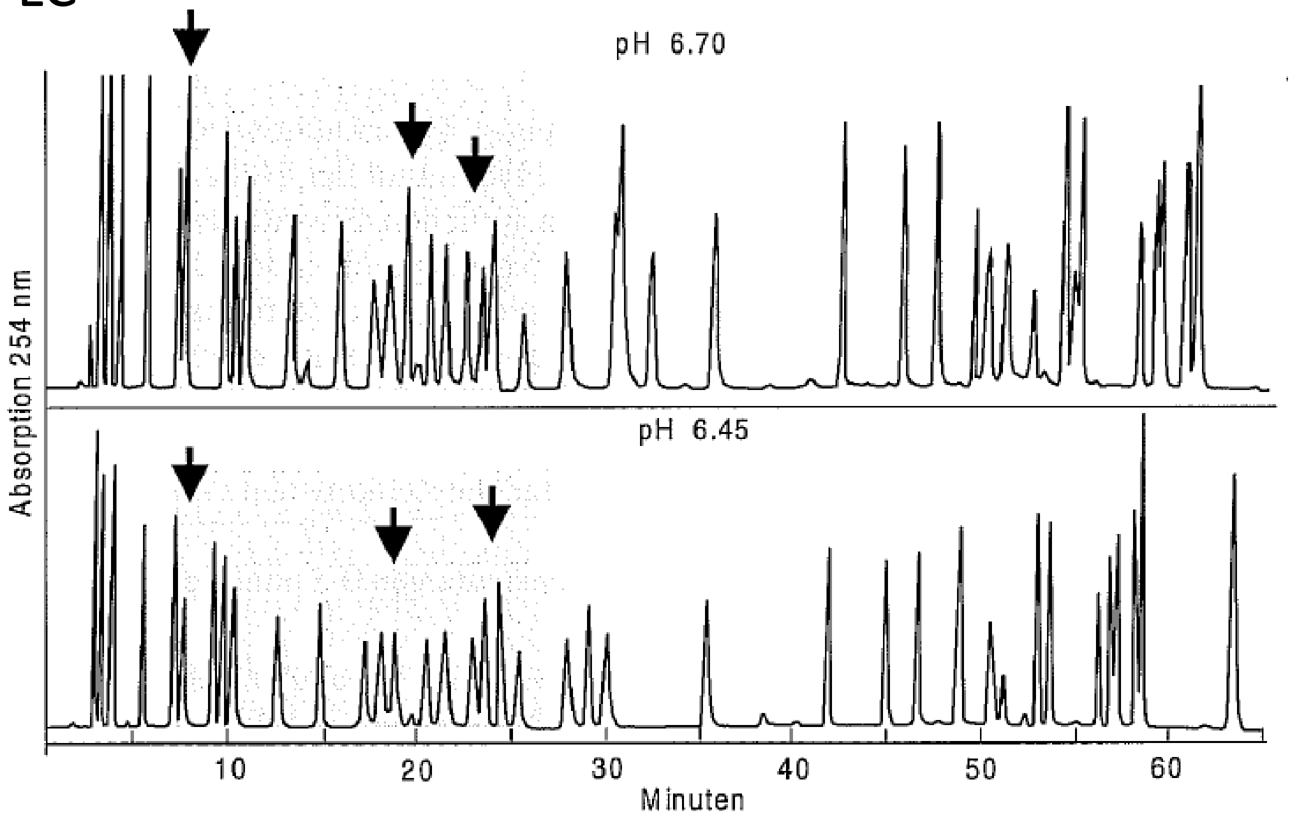
ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ (Ruggedness) (5)

Περίπτωση GC:

– Διαφορετικές στήλες (παρτίδες ή/και προμηθευτής)
– Θερμοκρασία
– Ταχύτητα ροής φέροντος αερίου

Robustness III

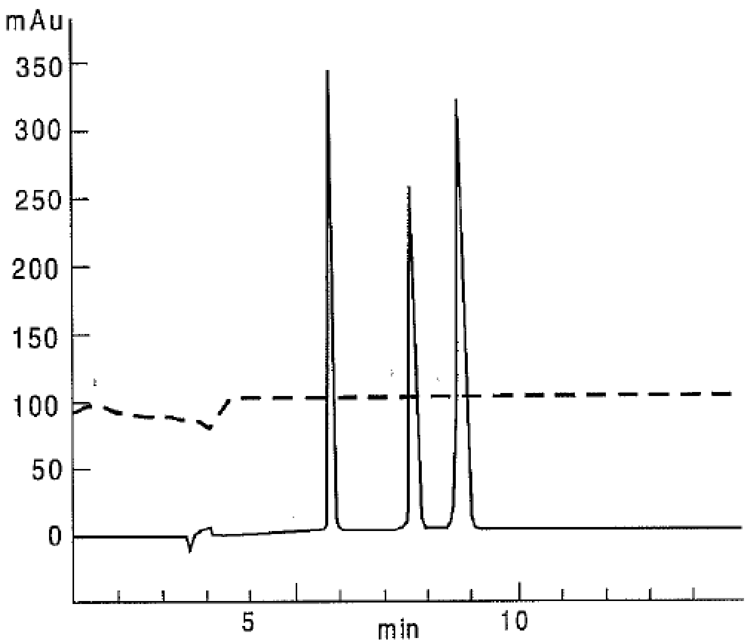
- Influence of pH of elution on separation of amino acids by RP-HPLC

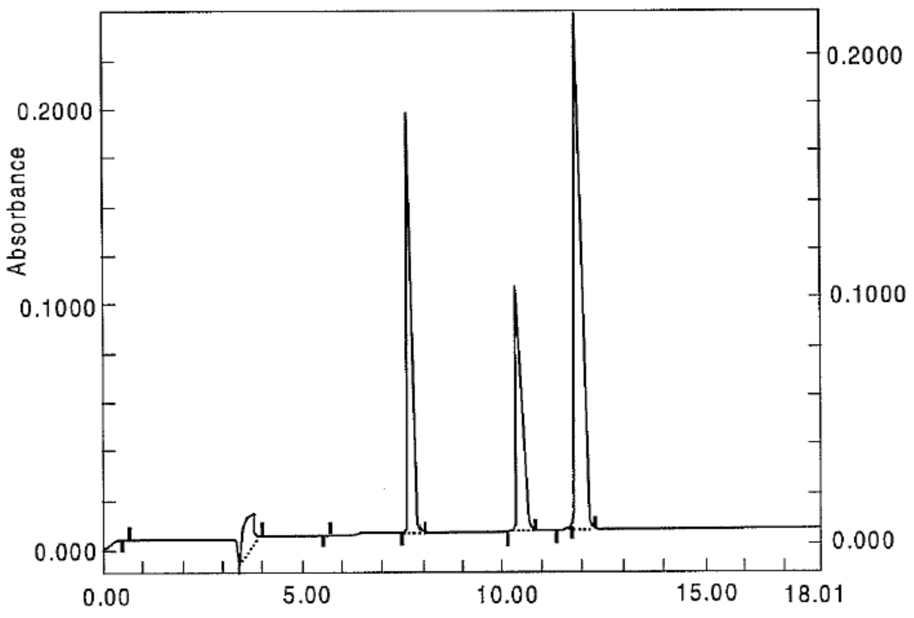


From: Waters, in: Stavros Kromidas, Validierung in der Analytik, Wiley-VCH

Robustness

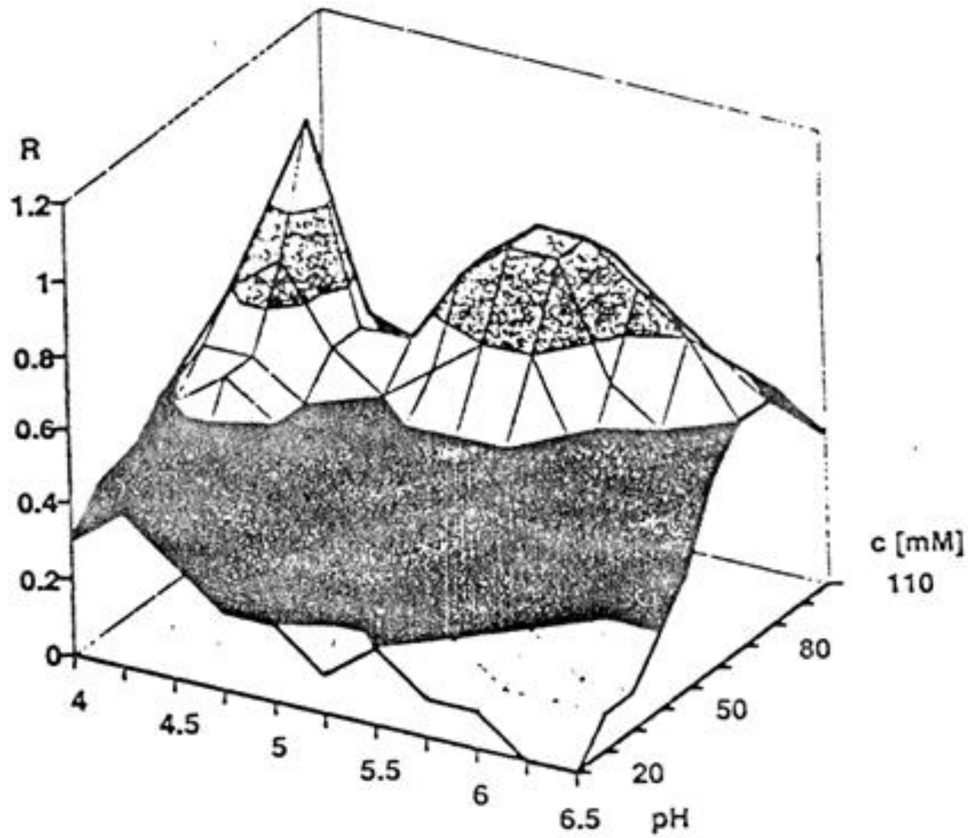
- Electropherograms under identical conditions by different analytical equipment





From: Dr. Michael Krämer, NOVARTIS, Basel, in: Stavros Kromidas, Validierung in der Analytik, Wiley-VCH

ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ (ΕΥΣΤΑΘΕΙΑ) (RUGGEDNESS)



ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ (SENSITIVITY) (1)

Εκφράζει τη μεταβολή του σήματος προς τη μεταβολή της συγκέντρωσης του αναλύτη, και έχει μονάδες σήματος προς συγκέντρωση.

Εκφράζεται από την κλίση (slope) της καμπύλης απόκρισης.

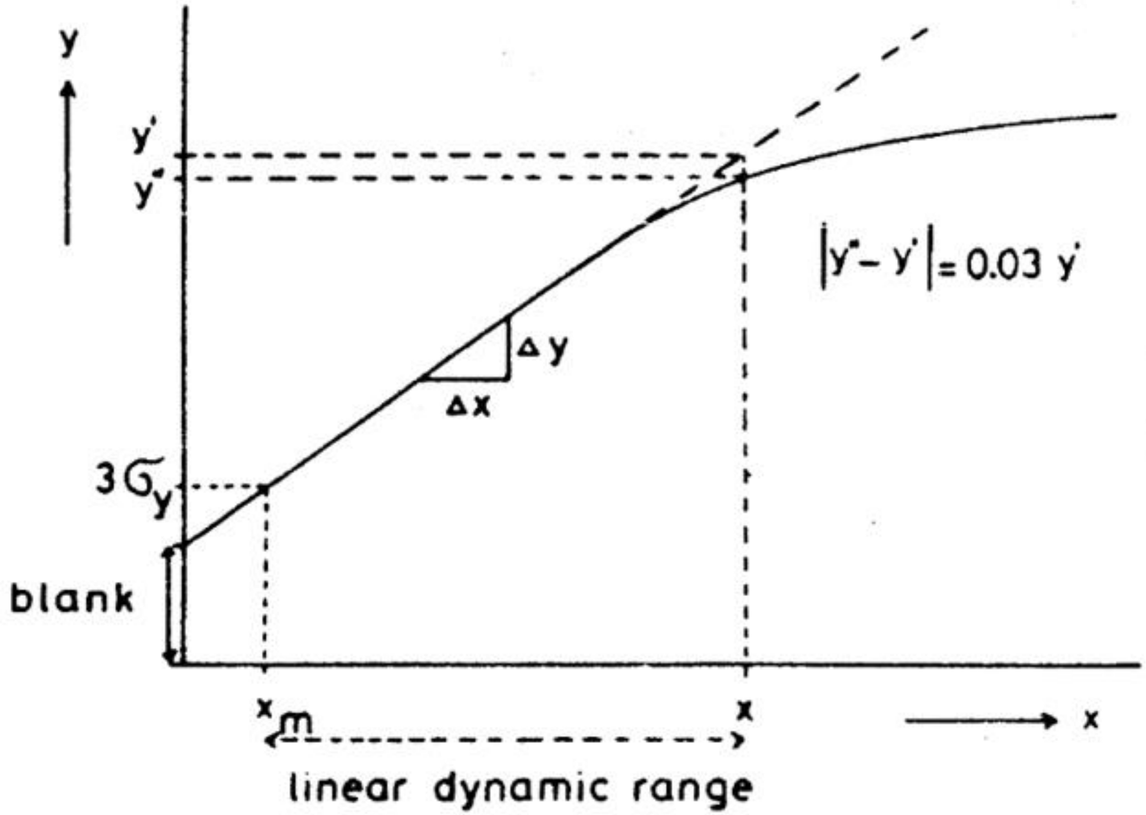
Η περιοχή στην οποία υπάρχει ευαισθησία και έχει μια σαφή τιμή, καλείται **δυναμική περιοχή (dynamic range).**

ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ (SENSITIVITY) (2)

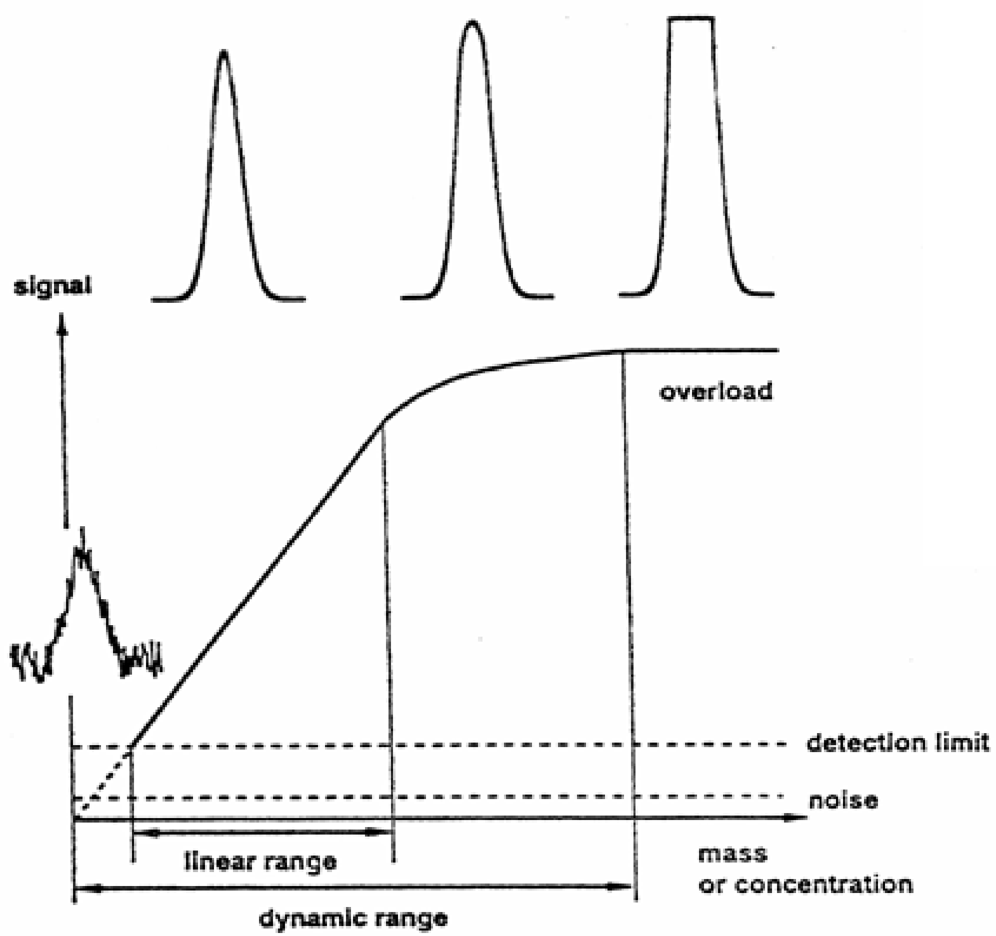
Η περιοχή στην οποία η ευαισθησία έχει σταθερή τιμή ονομάζεται **γραμμική δυναμική περιοχή (linear dynamic range).**

Παρόλο που σχετίζεται με το όριο ανίχνευσης (κατά κανόνα μεγάλη κλίση συνεπάγεται χαμηλό όριο ανίχνευσης) δεν πρέπει να συγχέονται.

ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ ΚΑΙ ΓΡΑΜΜΙΚΗ ΔΥΝΑΜΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ



ΚΑΜΠΥΛΕΣ ΑΠΟΚΡΙΣΗΣ ΑΝΙΧΝΕΥΤΗ – ΔΥΝΑΜΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΩΝ



- **USP 23 <621>**
  - **System Suitability Requirements**

Parameters	Recommendations
K'	In general k' ≥ 2.0
R	R > 2, between the peak of interest and the closest potential interferent (degradant, internal STD, impurity, excipient, etc.....)
T	T ≤ 2
N	In general N > 2000
Repeatability	RSD ≤ 2.0% (n ≥ 5)

ΣΤΑΔΙΑΚΟ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗΣ ΜΕΘΟΔΩΝ (1)

Robustness

- **Parameter 1** Mix and Max
- **Parameter 2** Mix and Max
- **Parameter 3** Mix and Max
- **Parameter 4** Mix and Max

Linearity Day 1-3

- **Level 1: 60%** Bulk and Formul.
- **Level 2: 80%** Bulk and Formul.
- **Level 3: 100%** Bulk and Formul.
- **Level 4: 120%** Bulk and Formul.
- **Level 5: 140%** Bulk and Formul.

Precision Day 1-3

- **Six Reps., 100%** Bulk Drug

ΣΤΑΔΙΑΚΟ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗΣ ΜΕΘΟΔΩΝ (2)

LOQ

Level 1
Bulk Drug

Level 2
Bulk Drug

Level 3
Bulk Drug

Level 4
Bulk Drug

Level 5
Bulk Drug

LOQ
Precision

LOQ Level
Bulk Drug

LOD

Six Blanks
Baseline Noise

ΑΠΑΡΑΙΤΗΤΕΣ ΠΡΟΔΙΑΓΡΑΦΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΠΙΤΥΧΗ ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΜΙΑΣ ΜΕΘΟΔΟΥ HPLC

Sampling, sample storage, sample preparation

Sample solvent

Mobile phase preparation, reagent quality

Temperature

Extra-column volumes

Dwell volume of gradient separation

Column dimensions

Volume flow rate of the mobile phase

Detailed identity of the stationary phase

Detector data

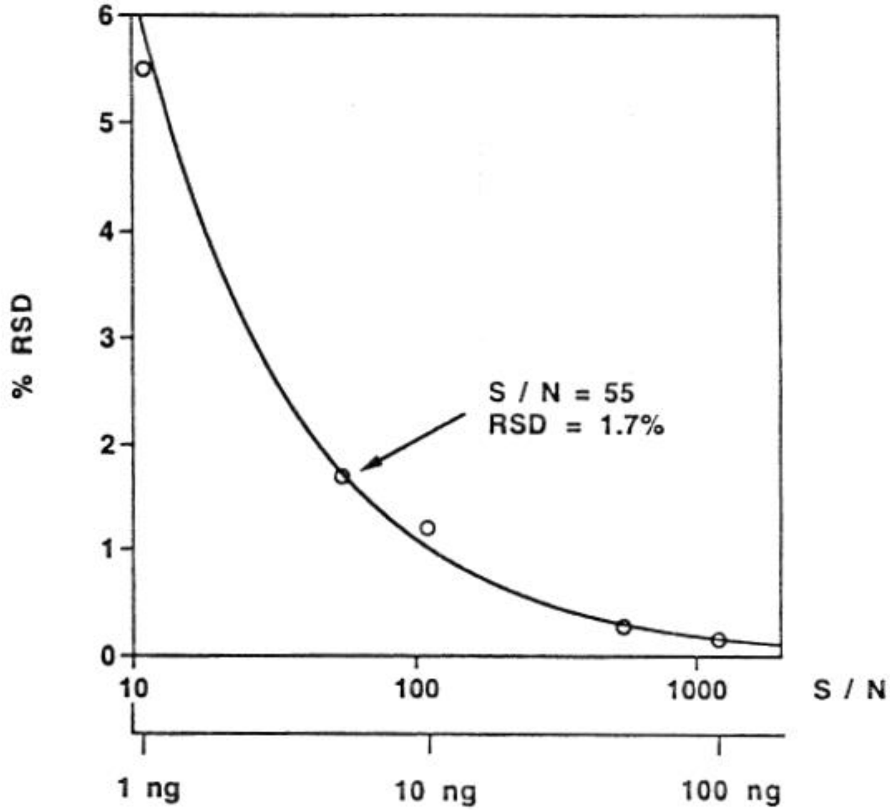
Integration parameters

ΚΑΝΟΝΕΣ ΓΙΑ ΑΚΡΙΒΗ ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΣΤΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ

Accurate Quantitative Analysis:

- Baseline resolution
- Avoid tailing
- Height determination for small peaks
- Small peaks must be eluted in frond of large ones if baseline resolution is not possible

ΜΕΙΩΣΗ ΕΠΑΝΑΛΗΨΙΜΟΤΗΤΑΣ ΩΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ ΤΟΥ ΘΟΡΥΒΟΥ



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.

Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑ ΒΙΟΥ ΜΑΘΗΣΗ
επένδυση στην κοινωνία της γνώσης
ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ
ΕΣΠΑ 2007-2013
πρόγραμμα για την ανάπτυξη
ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ
Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

Σημειώματα

Σημείωμα Ιστορικού Εκδόσεων Έργου

Το παρόν έργο αποτελεί την έκδοση 1.0.

Έχουν προηγηθεί οι κάτωθι εκδόσεις:

- Έκδοση διαθέσιμη εδώ.

Σημείωμα Αναφοράς

 Κουππάρης Μιχαήλ. «Έλεγχος και Διασφάλιση Ποιότητας». Έκδοση: 1.0. Αθήνα 2015.
Διαθέσιμο από τη δικτυακή διεύθυνση:
http://opencourses.uoa.gr/courses/CHEM103/

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.