

JAK WYZNACZA SIĘ PARAMETRY WALIDACYJNE

Przykład walidacji procedury analitycznej

Piotr KONIECZKA



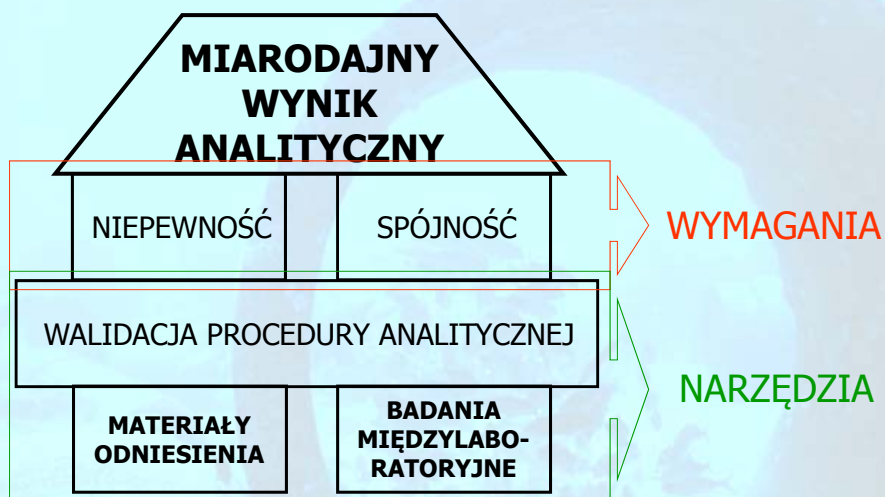
Katedra Chemii Analitycznej
Wydział Chemiczny
Politechnika Gdańska
ul. G. Narutowicza 11/12
80-233 GDAŃSK




e-mail: kaczor@chem.pg.gda.pl
piotr.konieczka@pg.gda.pl

GBC- Rodzinnie, Zakopane, 29.09-01.10.2010.

System jakości wyniku analitycznego



GBC- Rodzinnie, Zakopane, 29.09-01.10.2010.




DEFINICJA

„**walidacja psych.** proces ustalania stopnia odpowiedniości, trafności, celowości testu
albo **ważności, dokładności narzędzia pomiarowego.**

Etym. - śrdw. łac. *validatus* p.p. od *validare* 'zatwierdzać' z *validus* 'skuteczny, ważny' łac. 'silny' od *valēre* ”

Władysław Kopaliński „Słownik wyrazów obcych”

GBC- Rodzinnie, Zakopane, 29.09-01.10.2010.



Walidacja metody (ang. *method validation*) – proces oceny metody (lub procedury) analitycznej prowadzony w celu zapewnienia zgodności ze stawianymi tej metodzie wymogami, definiujący tę metodę oraz pozwalający określić jej przydatność.

Można więc mówić o:

- Ocenie metody
- Zgodności metody ze stawianymi jej wymogami
- Definicji metody
- Przydatności metody

GBC- Rodzinnie, Zakopane, 29.09-01.10.2010.

Proces walidacji powinien być przeprowadzony gdy:



- opracowywana jest nowa procedura analityczna,
- prowadzone są próby rozszerzenia zakresu stosowalności znanej procedury analitycznej np. do oznaczania danego analitu ale w innej matrycy,
- przeprowadzona kontrola jakości daje podstawę do wniosku, że występuje zmienność parametrów walidacyjnych w czasie,

GBC- Rodzinnie, Zakopane, 29.09-01.10.2010.

Proces walidacji powinien być przeprowadzony gdy:



- dana procedura analityczna ma być wykorzystywana w innym laboratorium,
- zostanie wykorzystana inna aparatura kontrolno-pomiarowa,
- badania będą przeprowadzone przez innego analityka,
- przeprowadza się porównanie nowej procedury analitycznej ze znaną procedurą standardową,

GBC- Rodzinnie, Zakopane, 29.09-01.10.2010.

Oprócz wyznaczenia parametrów walidacyjnych, przed przystąpieniem do samego procesu walidacji należy określić takie podstawowe cechy procedury analitycznej jak:

- rodzaj oznaczanego składnika,
- poziom stężeń,
- zakres stężeń analitu,
- rodzaj matrycy,
- obecność substancji przeszkadzających (interferentów) wraz z określeniem konieczności ich oznaczenia,

GBC- Rodzinnie, Zakopane, 29.09-01.10.2010.



cd:

- istnienie odgórnych regulacji i wymogów, którym powinna sprostać procedura analityczna,
- rodzaj oczekiwanej informacji – ilościowa czy jakościowa,
- wymagana wartość granicy wykrywalności i oznaczalności,
- oczekiwana i wymagana dokładność (precyzja i poprawność) procedury,

GBC- Rodzinnie, Zakopane, 29.09-01.10.2010.



cd:



- wymagana wrażliwość (odporność) procedury,
- wymagana aparatura – czy oznaczenia z wykorzystaniem danej procedury mają być przeprowadzone w oparciu a ściśle zdefiniowany instrument, czy też może być przeprowadzana w oparciu o aparaturę tego samego typu,
- możliwość zastosowania walidowanej procedury w innym laboratorium,

GBC– Rodzinnie, Zakopane, 29.09-01.10.2010.

Zestawienie parametrów procedury analitycznej podlegających procesowi walidacji zalecanych przez ICH i USP




Parametr	ICH	USP
Precyzja - powtarzalność	+	+
Precyzja - precyzja pośrednia	+	
Precyzja - odtwarzalność	+	
Dokładność/Poprawność	+	+
Granica wykrywalności	+	+
Granica oznaczalności	+	+
Specyficzność/selektywność	+	+
Liniowość	+	+
Zakres pomiarowy	+	+
Odporność (ang. <i>robustness</i>)		+
Elastyczność/tolerancyjność (ang. <i>ruggedness</i>)		+

ICH – The International Conference on Harmonization

USP – The United States Pharmacopoeia

GBC– Rodzinnie, Zakopane, 29.09-01.10.2010.

11 


Im większa jest liczba **parametrów walidacyjnych**, tym więcej czasu potrzeba na przeprowadzenie **procesu walidacji**.

Im bardziej restrykcyjny charakter mają przyjęte wartości graniczne (oczekiwane), tym częściej należy sprawdzać, kalibrować, czy wręcz rewalidować daną procedurę analityczną.

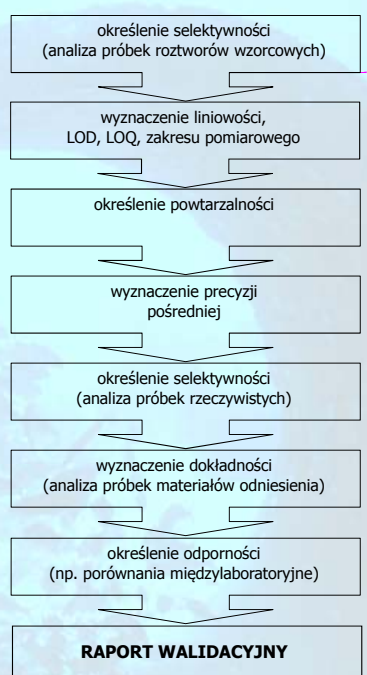
Nie zawsze istnieje konieczność przeprowadzania całego procesu walidacji procedury analitycznej.

Należy wówczas określić, który z parametrów powinien być włączony do procesu walidacji.

GBC- Rodzinnie, Zakopane, 29.09-01.10.2010.

12 

Proces walidacji procedury analitycznej może być przeprowadzony właściwie w dowolnej kolejności (**biorąc pod uwagę kolejność określania badanych parametrów**), jednak najbardziej logicznym wydaje się jej przeprowadzenie zgodnie ze schematem:



```

graph TD
    A[określenie selektywności  
(analiza próbek roztworów wzorcowych)] --> B[wyznaczenie liniowości,  
LOD, LOQ, zakresu pomiarowego]
    B --> C[określenie powtarzalności]
    C --> D[wyznaczenie precyzji  
pośredniej]
    D --> E[określenie selektywności  
(analiza próbek rzeczywistych)]
    E --> F[wyznaczenie dokładności  
(analiza próbek materiałów odniesienia)]
    F --> G[określenie odporności  
(np. porównania międzylaboratoryjne)]
    G --> H[RAPORT WALIDACYJNY]
  
```

GBC- Rodzinnie, Zakopane, 29.09-01.10.2010.



Proces walidacji procedury analitycznej powinien być uwieńczony poprzez sporządzenie raportu końcowego zawierającego:

- przedmiot i przeznaczenie procedury analitycznej (zakres jej stosowalności, rodzaj),
- podstawy metrologiczne,
- rodzaj analitu(ów) i skład matrycy,
- spis wszystkich wykorzystywanych odczynników, wzorców, materiałów odniesienia wraz z ich dokładną specyfikacją (czystość, jakość, producent, w przypadku syntezy w laboratorium – dokładny opis tej syntezy),

GBC- Rodzinnie, Zakopane, 29.09-01.10.2010.



cd:

- opis procedur służących do sprawdzania czystości stosowanych substancji i jakości wykorzystywanych wzorców,
- konieczne środki ostrożności,
- plan opisujący sposób „przeniesienia” procedury z warunków laboratoryjnych do pomiarów rutynowych,
- parametry procedury analitycznej,
- spis parametrów krytycznych – tzn. tych, których niewielkie wahania mogą w sposób znaczący wpływać na wynik końcowy oznaczenia – parametry wynikające z określenia odporności procedury analitycznej,

GBC- Rodzinnie, Zakopane, 29.09-01.10.2010.

cd:



- wykaz wszelkiego rodzaju sprzętu laboratoryjnego wraz z ich cechami charakterystycznymi (wymiary, klasa dokładności itp.), schematy blokowe w przypadku skomplikowanych zestawów aparaturowych,
- szczegółowy opis warunków przeprowadzenia pomiarów z wykorzystaniem danej procedury analitycznej,
- opis procedury statystycznej (na etapie obróbki zbiorów wyników) wraz z wykazem równań i przeprowadzonych obliczeń,
- opis procedury kontroli jakości wyników (w przypadku analiz rutynowych),

GBC- Rodzinnie, Zakopane, 29.09-01.10.2010.

cd:



- odpowiednie rysunki i wykresy np. chromatogramy, krzywe kalibracyjne,
- zgodność wyznaczonych parametrów procedury z założonymi wartościami granicznymi,
- wartość niepewności pomiaru analitycznego,
- kryteria, które należy spełnić w procesie rewalidacji,
- dane osoby, przeprowadzającej proces walidacji,
- spis wykorzystywanej literatury,
- podsumowanie i wnioski,
- potwierdzenie i podpis osoby odpowiedzialnej za sprawdzenie i zatwierdzenie procesu walidacji.

GBC- Rodzinnie, Zakopane, 29.09-01.10.2010.

Opracowano metodę oznaczania zawartości kadmu w próbkach kapusty.

Próbki kapusty przygotowano w następujący sposób:

1. Liofilizacja
2. Mineralizacja wspomaganą promieniowaniem mikrofalowym z wykorzystaniem stężonego kwasu azotowego V
3. Otrzymany mineralizat rozcieńczano do objętości końcowej 25 cm³



GBC- Rodzinnie, Zakopane, 29.09-01.10.2010.

Oznaczenie końcowe przeprowadzono z wykorzystaniem techniki GF-AAS, stosując aparat SavantAA Z firmy GBC.



WYKORZYSTANIE KAPUSTY BIAŁEJ NA POTRZEBY FITOREMEDIACJI I BIOFUMIGACJI GLEBY



GBC- Rodzinnie, Zakopane, 29.09-01.10.2010.

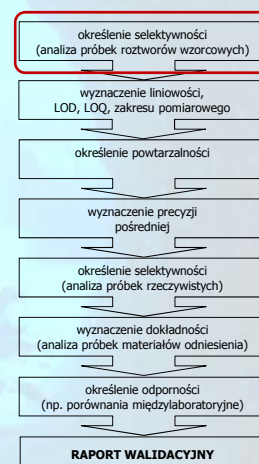
PARAMETRY WALIDACYJNE



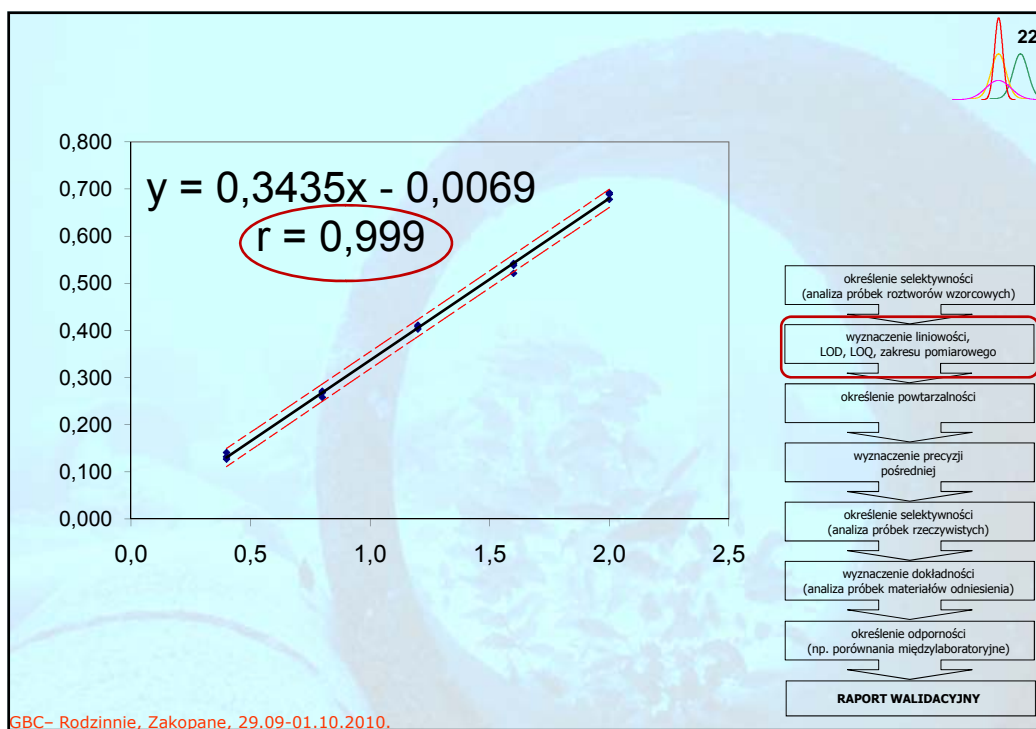
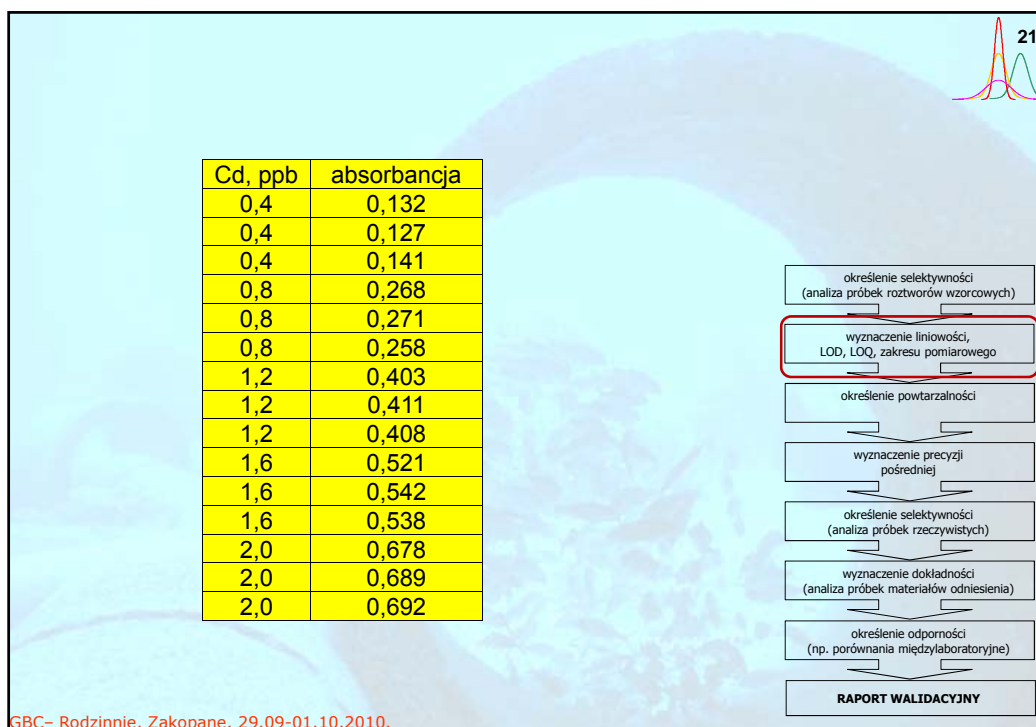
- Precyzja
 - powtarzalność
 - precyzja pośrednia
 - odtwarzalność
- Dokładność i poprawność
- Granica wykrywalności i oznaczalności
- Selektowność
- Liniowość i zakres pomiarowy
- Tolerancyjność i odporność
- Niepewność

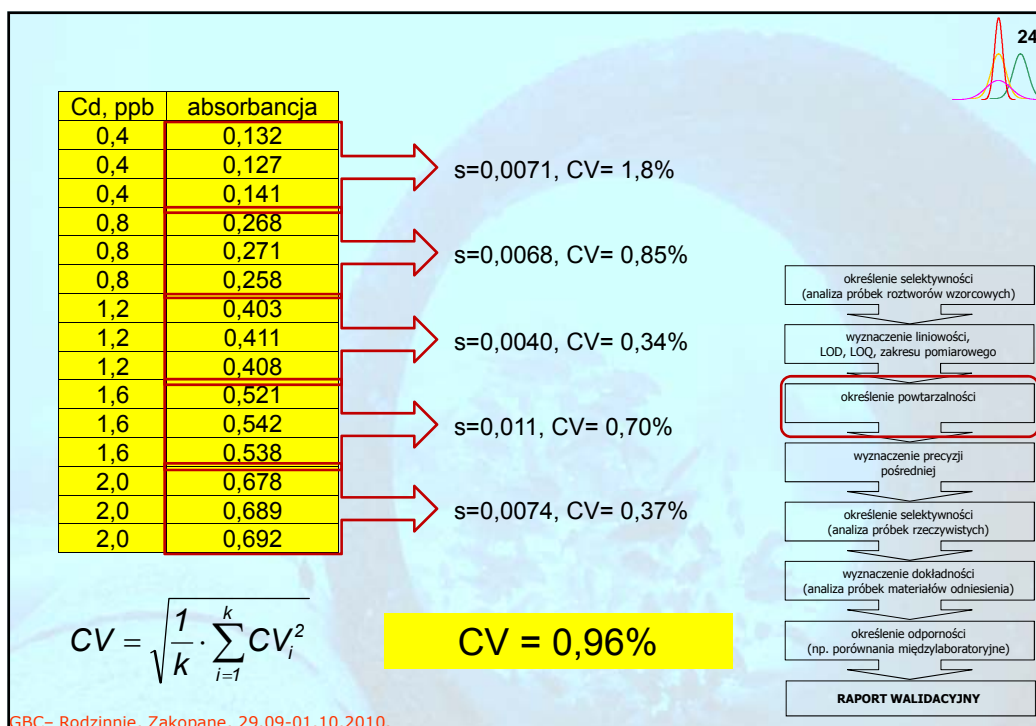
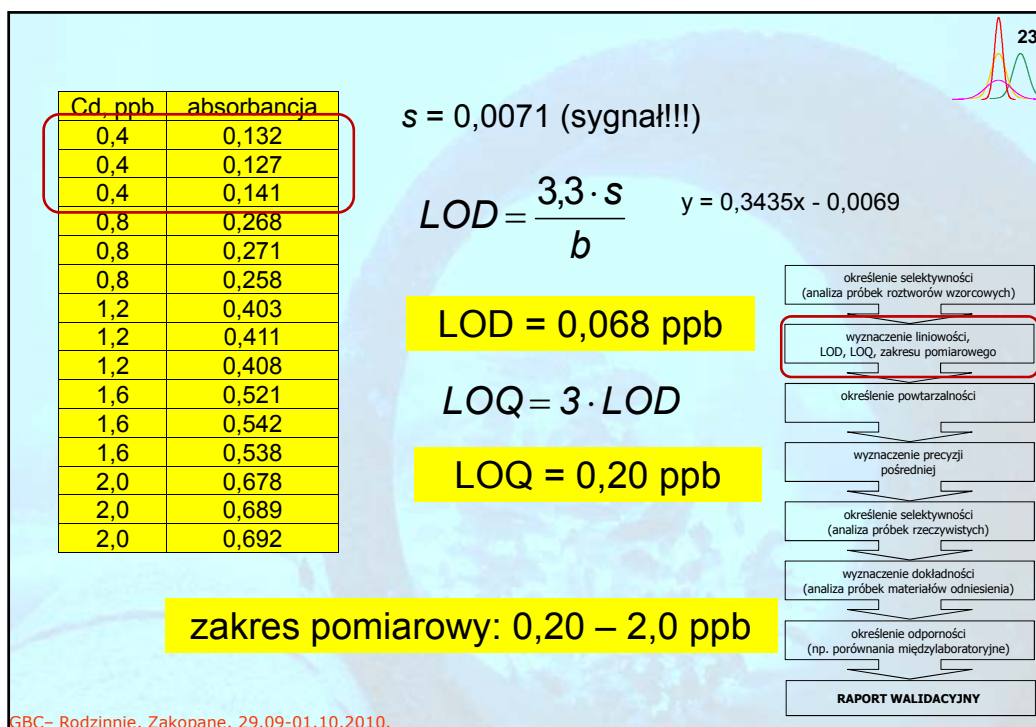
GBC- Rodzinnie, Zakopane, 29.09-01.10.2010.

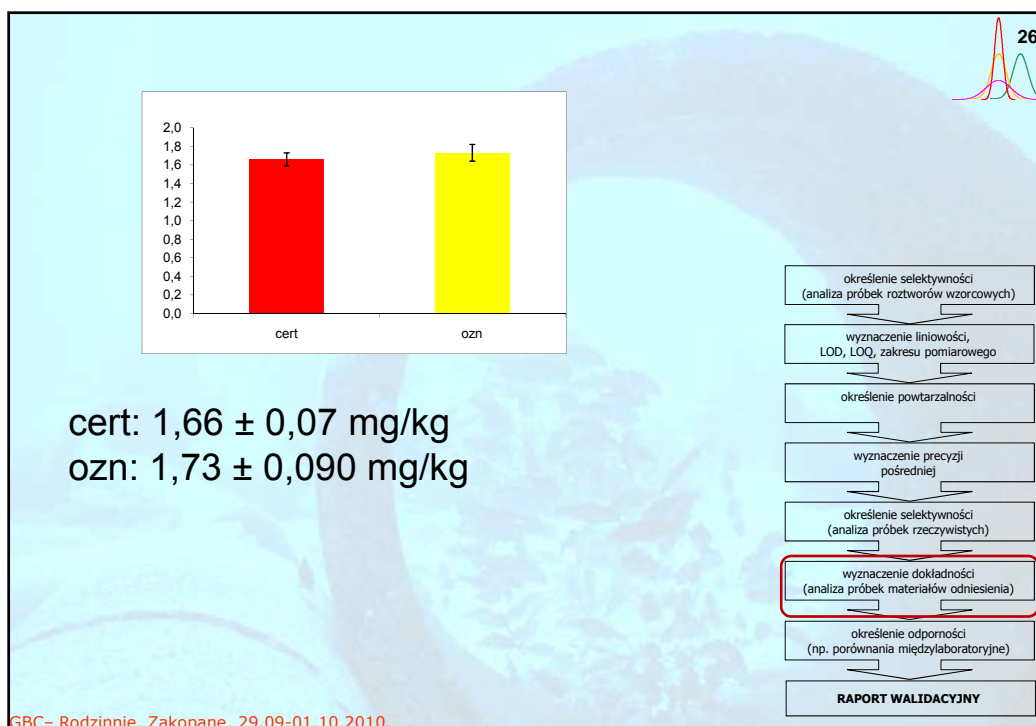
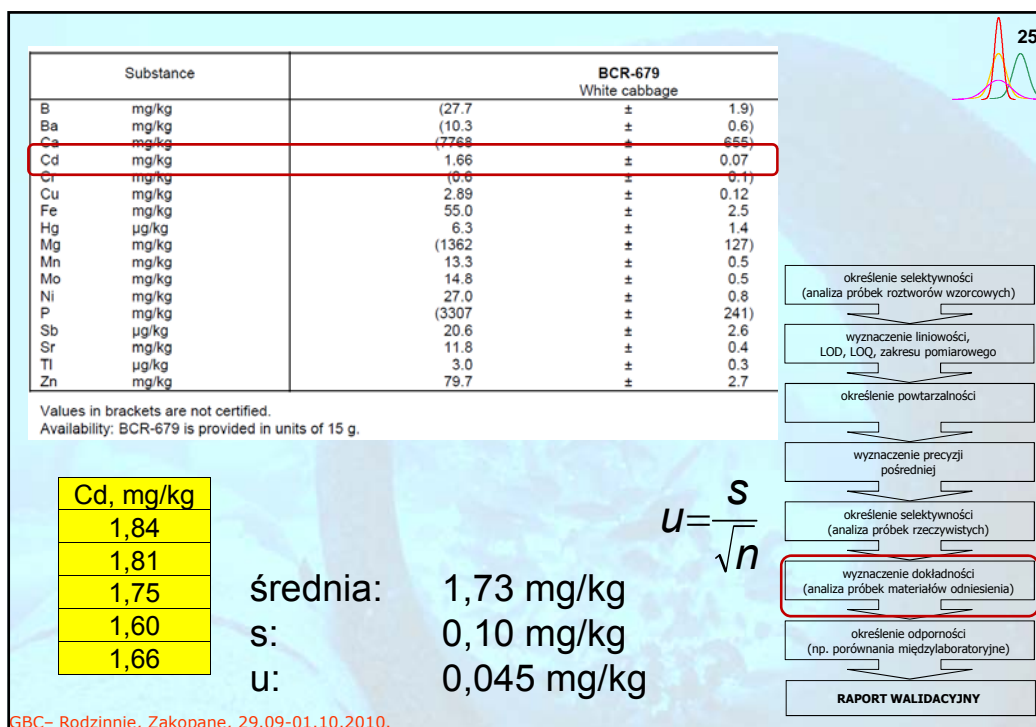
Selektywny pomiar absorbancji przy charakterystycznej długości fali – 228,8 nm i z zastosowaniem korekcji tła - wzdluzny efektu Zeemana



GBC- Rodzinnie, Zakopane, 29.09-01.10.2010.







27

R = 104,2%

U = 6,7%

Poprawność: = 104,2 ± 6,7%

$$R = \frac{X_{ozn}}{X_{CRM}} \cdot 100\%$$

$$U = k \cdot \frac{\sqrt{u_{(X_{ozn})}^2 + u_{(X_{CRM})}^2}}{\left(\frac{X_{ozn} + X_{CRM}}{2}\right)}$$

Poprawność = $R \pm U$

GBC- Rodzinnie, Zakopane, 29.09-01.10.2010.

28

Oznaczenia dla próbki rzeczywistej

Cd, mg/kg
3,176
3,274
3,076

→ średnia = 3,175 mg/kg; s=0,099 mg/kg, CV= 3,1%

masa próbki – 0,50 g	→	wynik „odczytany” z krzywej – 0,846 ppb
objętość mineralizatu – 25 cm ³		
rozcieńczenie: 1÷5 (odpowiednie pH)		
autorozcieńczenie – przyrząd 0,067		

GBC- Rodzinnie, Zakopane, 29.09-01.10.2010.

