

Walidacja metod bioanalitycznych stosowanych w badaniach farmakokinetycznych

Michał Kaza, Anna Szlagowska, Piotr Rudzki

Instytut Farmaceutyczny, Zakład Farmakologii, Laboratorium Biodostępności Leków, Warszawa

Adres do korespondencji: Michał Kaza, Instytut Farmaceutyczny, Zakład Farmakologii, Laboratorium Biodostępności Leków, ul. Rydygiera 8, 01-793 Warszawa, tel. 022 456 38 57, e-mail: m.kaza@ifarm.waw.pl

Wstęp

Badania farmakokinetyczne są wykonywane w czasie całego cyklu życia produktu leczniczego: od badań naukowych nad substancjami o spodziewanym działaniu leczniczym, poprzez badania wymagane przez podmioty odpowiedzialne, m.in. Urząd Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych, w celu dopuszczenia produktu leczniczego do obrotu, aż po monitorowanie stężenia leku u pacjenta podczas terapii. Wiarygodność wyników badań farmakokinetycznych, w tym badań dostępności i równoważności biologicznej, jest kluczowym elementem dla zapewnienia skuteczności i bezpieczeństwa stosowania produktów leczniczych. Z tego względu zasady prowadzenia badań są regulowane przez szczegółowe wytyczne na poziomie międzynarodowym, np.: WHO, ICH, EMEA oraz lokalnym, np.: FDA, Health Canada.

Ważnym elementem badania farmakokinetycznego jest część bioanalityczna, w której oznaczane są stężenia badanej substancji i/lub jej metabolitu w próbkach materiału biologicznego (tzw. matrycy), np.: krwi, osoczu, surowicy lub moczu [1]. Ze względu na złożony charakter matrycy, będącej mieszaniną składników odżywczych i produktów przemiany materii oraz niskie stężenia analitu w próbkach (wyrażane w µg/ml, ng/ml lub pg/ml), wykonanie oznaczeń nie jest sprawą prostą. Dodatkowymi utrudnieniami mogą być również szeroki zakres badanych stężeń, nierzadko obejmujący trzy rzędy wielkości, a także duża liczba próbek materiału biologicznego przeznaczona do analizy w trakcie badania.

W celu zapewnienia wiarygodności uzyskiwanych wyników wymagane jest przeprowadzenie walidacji zgodnie z międzynarodowymi wytycznymi [2–4]. Walidacja metody bioanalitycznej polega na potwierdzeniu powtarzalności metody oznaczania leku lub jego metabolitu w materiale biologicznym i powinna być wykonywana zgodnie z międzynarodowymi wytycznymi.

Validation of bioanalytical methods in pharmacokinetic studies

Validation process demonstrates that a particular method used for quantitative measurement of analytes is reliable and reproducible for the intended use. In case of pharmacokinetic studies correctly planned and performed validation increases safety of patients after administration of pharmaceuticals. During the pharmacokinetic evaluation, the important role of bioanalytical procedures, i.e. the quantitative determination of drugs and/or metabolites in biological matrices such as blood, serum, plasma or urine, should be stressed. In an article recommended range of bioanalytical method validation was characterized including detailed description of the elementary parameters. Acceptance criteria of validation in accordance with EMEA and FDA guidances were described as well.

Keywords: validation, bioanalytical method, bioavailability, bioequivalence, pharmacokinetics, biological matrix.

© Farm Pol, 2009, 65(12): 839-844

W każdym przypadku projekt walidacji metody powinien uwzględniać specyfikę danego badania oraz zastosowanej techniki analitycznej, którą zazwyczaj jest wysokosprawną chromatografią cieczową HPLC, coraz częściej łączy się ze spektrometrią mas (LC-MS, **rycina 1**). Dzięki temu możliwy jest wybór optymalnego zakresu stężeń badanej substancji oraz wykonanie odpowiednich doświadczeń dodatkowych, np. określenie wpływu matrycy w metodach LC-MS [5]. Laboratorium które przeprowadza walidację metody, powinno w całości udokumentować kompletność tego procesu poprzez opracowanie sprawozdania.

Walidacja przed rozpoczęciem analizy próbek badanych

W ramach walidacji metod bioanalitycznych oceniane są następujące parametry:



Rycina 1. Tandemowy spektrometr mas Quattro Micro™ API firmy Micromass połączony z zestawem HPLC firmy Waters (LC-MS-MS)

- precyzja,
- dokładność,
- selektywność,
- granica wykrywalności (LOD, *Limit of Detection*),
- dolna granica oznaczalności (LLOQ, *Lower Limit of Quantification*),
- liniowość,
- odzysk,
- stabilność badanej substancji,
- przeniesienie próbki.

Wymienione parametry należy określić przed przystąpieniem do oznaczania próbek pobranych od ochotników, z wyjątkiem badania stabilności długoterminowej, wykonywanego zazwyczaj po zakończeniu analiz próbek badanych.

Precyzja

Precyzja określa stopień zgodności wyników wielokrotnych analiz tej samej próbki. Miarą precyzji jest współczynnik wariancji (CV): stosunek odchylenia standardowego i wartości średniej wyników pomiarów. Wyznaczenie precyzji służy do oceny zgodności wyników otrzymanych w krótkim okresie przez tego samego analityka, na tym samym przyrządzie, z jednakowymi odczynnikami lub w różnych dniach i/lub przez różnych analityków i/lub przy użyciu różnej aparatury. Współczynnik wariancji dla każdego stężenia nie powinien być większy niż 15%, z wyjątkiem najniższego stężenia na krzywej kalibracyjnej (LLOQ), dla którego $CV \leq 20\%$.

Dokładność

Dokładność określa stopień zgodności wyników badań uzyskanych daną metodą z wartością przyjętą jako prawdziwa, np. wartością nominalną lub z wynikami uzyskanymi ustaloną metodą odniesienia. Metoda jest dokładana, jeżeli pozwala otrzymać wyniki bliskie wartości rzeczywistej i nieobarczone

błędem systematycznym. Miarą dokładności jest iloraz średniej wartości wyników pomiarów oraz ich teoretycznej (prawdziwej) wartości. Dokładność należy zbadać w ciągu jednej sekwencji analitycznej (czyli jednego uporządkowanego zestawu próbek analizowanych w danym okresie), jak i między sekwencjami (w ciągu kilku dni). Średnia wartość mierzona dla każdego ze stężeń powinna mieścić się w przedziale 85–115%, z wyjątkiem najniższego stężenia na krzywej kalibracyjnej (LLOQ), dla którego przedział wynosi 80–120%.

Selektywność

Selektywność metody to możliwość odróżnienia substancji badanej oraz wzorca wewnętrznego od innych związków zawartych w próbce oraz możliwość ilościowego oznaczenia substancji badanej w obecności innych substancji w próbce. Wytyczne FDA zalecają analizę próbek ślepych – próbek materiału biologicznego niezawierających ani substancji oznaczanej, ani wzorca wewnętrznego (IS, *Internal standard*), pochodzących z co najmniej sześciu różnych źródeł. Zanieczyszczenia w miejscu preparatu nie mogą przekraczać 20% LLOQ, a w miejscu wzorca wewnętrznego 5% wartości sygnału pomiarowego uzyskanego po analizie użytego w badaniach stężenia. Jeżeli ponad 10% próbek zerowych nie spełnia tych warunków, należy wykonać dodatkowe analizy.

W metodach LC-MS istnieje ryzyko wystąpienia zjawiska tłumienia lub wzmacniania jonizacji przez niewykrywane substancje obecne w próbce. Dlatego w czasie walidacji należy przeprowadzić doświadczenia pozwalające na określenie wpływu matrycy na dokładność, precyzję i czułość metody [5]. Doświadczenia te wykonuje się dla wybranych stężeń z zakresu kalibracji, przygotowując próbki z dodatkiem substancji badanej i IS w materiale biologicznym pochodzącym z różnych źródeł, np. w osoczu od różnych ochotników lub pacjentów.

Granica wykrywalności (LOD – *Limit of Detection*)

Granica wykrywalności jest to najniższe stężenie badanego związku w próbkach po ekstrakcji, które może być w sposób wiarygodny odróżnione od szumów linii podstawowej, tzn. gdy stosunek wartości sygnału pochodzącego od substancji badanej do szumów (S/N) wynosi od 2 do 3. Parametr LOD może być również wyznaczony na podstawie standardowego błędu oceny y względem x ($S_{y,x}$) oraz wartości współczynnika nachylenia krzywej kalibracyjnej.

Dolna granica oznaczalności (LLOQ – *Lower Limit of Quantification*)

Dolna granica oznaczalności jest to najniższe stężenie na krzywej kalibracyjnej, które może być

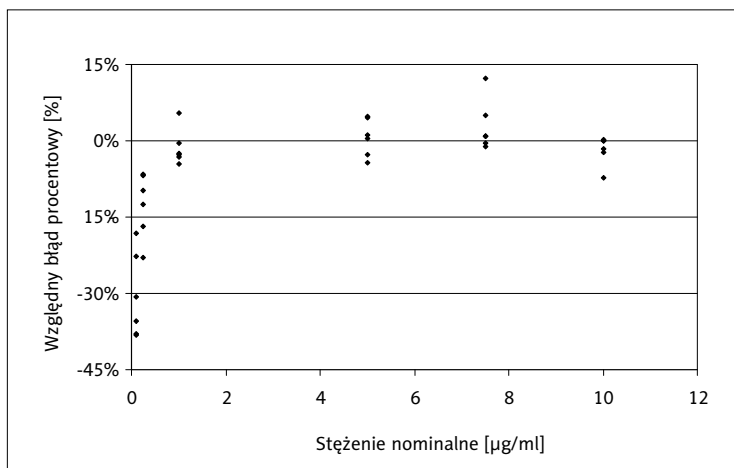
oznaczone z akceptowalną dokładnością (80–120%) i precyzją ($C \leq 20\%$). W celu wyznaczenia LLOQ należy wykonać analizy próbek substancji badanej o danym stężeniu po ekstrakcji z materiału biologicznego. Pík substancji badanej na chromatogramie musi być możliwy do identyfikacji. Stosunek wysokości sygnału pochodzącego od substancji badanej do szumów linii podstawowej w próbce ślepej musi wynosić co najmniej 5 ($S/N \geq 5$).

Liniowość

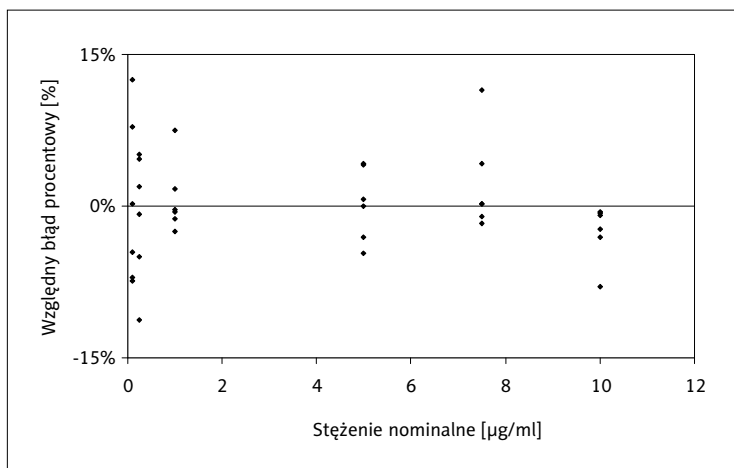
Liniowość metody określa zakres stężeń, w którym uzyskiwane wartości sygnału pomiarowego substancji badanej są wprost proporcjonalne do analizowanych stężeń. Ilość próbek kalibracyjnych oraz wartości ich stężeń (zakres kalibracji) są ustalane dla każdego badania na podstawie oczekiwanych stężeń związku badanego w próbkach. Niekorzystny jest zbyt duży zakres kalibracji, ze względu na trudności w uzyskaniu akceptowalnej precyzji i dokładności na końcach zakresu. Zbyt mały zakres może z kolei spowodować konieczność powtórnej analizy próbek po rozcieńczeniu. Krzywą kalibracyjną należy wykonać dla każdego badanego związku w próbce, pamiętając o zachowaniu takich warunków, w jakich przeprowadzone będzie oznaczenie próbek badanych. Próbkę kalibracyjną przygotowuje się przez dodanie znanej ilości roztworu wzorcowego do wolnego od zanieczyszczeń materiału biologicznego. W skład krzywej wchodzi następujące punkty: próbka ślepa – próbka materiału biologicznego niezawierająca ani substancji oznaczanej, ani wzorca wewnętrznego; próbka zerowa – próbka materiału biologicznego z dodanym wzorcem wewnętrznym, niezawierająca substancji oznaczanej oraz próbki kalibracyjne (w tym LLOQ). Zazwyczaj na potrzeby wyznaczenia zakresu liniowości wykonuje się 6 powtórzeń dla każdej z próbek kalibracyjnych, tzn. przygotowuje się 6 krzywych kalibracyjnych.

Oprócz doboru stężeń próbek kalibracyjnych, istotną sprawą jest również dokonanie właściwego wyboru modelu kalibracji. Zalecane jest zastosowanie najprostszego modelu, opartego na regresji liniowej $y=ax+b$. W przypadku wykonywania oznaczeń w szerokim zakresie stężeń, obejmującym nierzadko 3 rzędy wielkości, mogą wystąpić problemy z uzyskaniem liniowości. Występowaniu takich problemów może zapobiegać zastosowanie bardziej skomplikowanych modeli, np. regresji liniowej ważonej. Przy wyborze modelu regresji pomocne są graficzne przedstawienia względnych błędów procentowych. Przykładową ilustracją rozkładu błędów uzyskanych przy zastosowaniu regresji liniowej i regresji liniowej ważonej dla tego samego zestawu danych przedstawiono na **wykresach 1 i 2**.

W modelu regresji liniowej bez ważenia wartości względnego błędu procentowego dla najniższego



Wykres 1. Wykres względnego błędu procentowego w funkcji stężenia nominalnego dla modelu regresji liniowej nieważonej ($w=1$)

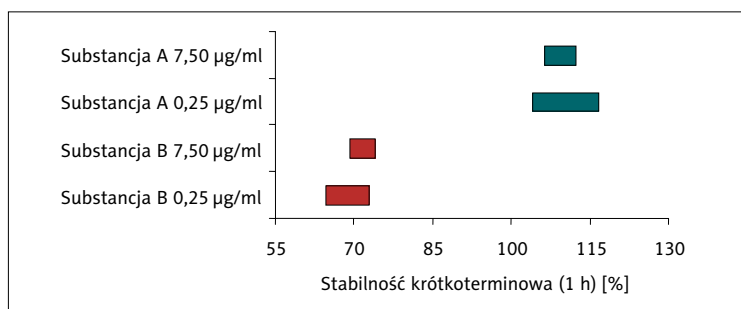


Wykres 2. Wykres względnego błędu procentowego w funkcji stężenia nominalnego dla tych samych danych, które zostały przedstawione na wykresie 1, po zastosowaniu modelu regresji liniowej ważonej ($w=1/x^2$)

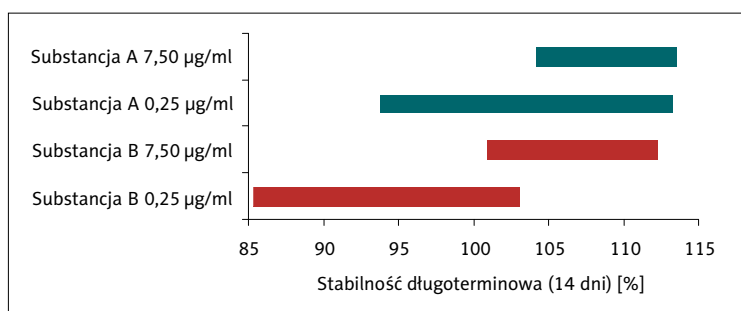
stężenia (LLOQ) wykraczają poza dopuszczalną granicę 20%. Po zastosowaniu odpowiedniego modelu ważenia, w tym przypadku $1/x^2$, wartość błędu dla każdego stężenia na krzywej kalibracyjnej mieszczą się w akceptowalnym zakresie.

Odzysk

Odzysk określa wydajność ekstrakcji. Parametr oblicza się porównując wartości sygnału pomiarowego uzyskane po ekstrakcji z materiału biologicznego zawierającego znaną ilość związku badanego, do bezpośrednio nastrzykniętego roztworu wzorcowego. Nie jest wymagane, żeby odzysk był wysoki, np. 90%. Wyniki oznaczeń muszą być przede wszystkim stałe, precyzyjne i powtarzalne w całym zakresie analizowanych stężeń. Jeżeli w badaniu stosuje się wzorzec wewnętrzny, odzysk należy wyznaczyć również dla tej substancji. W przypadku metod LC-MS zaleca się ocenę odzysku poprzez porównanie wyników otrzymanych dla próbek materiału biologicznego, do których



Wykres 3. Graficzne przedstawienie 90% przedziałów ufności w zakresie 85–115% dla stabilności krótkoterminowej w temperaturze pokojowej próbek osocza zawierających substancję A i B w dwóch różnych stężeniach. Dla niższego stężenia substancji A przedział ufności wykracza poza dopuszczalną granicę stabilności 85–115%. Również dla żadnego ze stężeń substancji B nie zostały spełnione kryteria akceptacji. Przedziały ufności znajdują się poniżej dopuszczalnej granicy stabilności. Obie substancje są niestabilne w danych warunkach przechowywania



Wykres 4. Graficzne przedstawienie 90% przedziałów ufności w zakresie 85–115% dla stabilności długoterminowej w temperaturze -20°C próbek osocza zawierających substancję A i B w dwóch różnych stężeniach. Kryteria akceptacji zostały spełnione. Dla obu związków w obu stężeniach przedziały ufności nie wykraczają poza dopuszczalną granicę 85–115%. Substancje są stabilne w danych warunkach przechowywania

dodano roztwór wzorcowy przed ekstrakcją, z wynikami dla próbek z wzorcem dodanym po ekstrakcji. Obliczony w ten sposób odzysk odzwierciedla rzeczywistą wydajność ekstrakcji, wolną od wpływu materiału biologicznego [5].

Stabilność

Termin stabilność oznacza trwałość badanego związku w roztworach oraz materiale biologicznym, przechowywanych w danych warunkach i określonym czasie. W ramach badania stabilności wykonuje się test zamrażania–rozmarzania, dokonuje się oceny stabilności krótkoterminowej, długoterminowej, stabilności próbek (po ekstrakcji) w autosamplerze oraz stabilności roztworów. Badania stabilności powinny dotyczyć także sytuacji, które z dużym prawdopodobieństwem mogą się zdarzyć w czasie badania (np. przechowywanie odparowanych próbek).

Obliczenia służące do porównania stabilności analitu, w próbkach badanych i w próbkach odniesienia, należy wykonywać na podstawie wartości stężeń

odczytanych z krzywej kalibracyjnej. Dopuszczalna jest ocena parametru przez bezpośrednie porównanie stężeń w próbkach badanych i odniesienia, jednak zalecane jest wykonywanie obliczeń z zastosowaniem bardziej zaawansowanych narzędzi statystycznych, np. za pomocą przedziałów ufności [6]. Próbkę uważane są za stabilne, jeżeli w porównaniu do próbek odniesienia uzyskane wyniki (np. stężenia odczytane z krzywej kalibracyjnej) mieszczą się w akceptowalnym przedziale. Przykładowe wyniki badań stabilności, niespełniające i spełniające kryteria akceptacji, przedstawiono w formie graficznej na **wykresach 3 i 4**.

Test rozmrażania i zamrażania określa stopień strat substancji spowodowany wielokrotnym rozmrażaniem i zamrażaniem próbek badanych. Badanie stabilności krótkoterminowej pozwala ocenić zmiany stężenia związku badanego w materiale biologicznym przechowywanym przez kilka lub kilkanaście godzin w temperaturze pokojowej. Natomiast stabilność długoterminowa w warunkach przechowywania, np. -20°C jest określana od dnia pobrania próbek od ochotników w klinice do dnia analizy ostatniej próbki w laboratorium.

W razie degradacji analitów w materiale biologicznym zalecane jest dodanie do próbek związków poprawiających stabilność – m.in. przeciwutleniaaczy i inhibitorów enzymów, np. kwasu askorbowego, w przypadku oznaczania w osoczu olanzapiny – leku stosowanego w leczeniu schizofrenii czy tetrahydrourydyny, w przypadku oznaczania gemcytabiny – leku stosowanego w leczeniu chorób nowotworowych [7, 8]. Zdarza się, że w procesie przygotowania próbek konieczne jest obniżenie temperatury, jeżeli analit rozkłada się w temperaturze pokojowej lub stosowanie odpowiedniego oświetlenia, jeżeli związek ulega fotodegradacji.

Badanie stabilności w autosamplerze pozwala ocenić trwałość rozpuszczonych próbek po ekstrakcji, które przez kilkanaście godzin oczekują na analizę. Natomiast stabilność roztworów dotyczy trwałości roztworów wzorcowych, podstawowych i roboczych, substancji badanej i wzorca wewnętrznego, przechowywanych w warunkach laboratoryjnych.

Przeniesienie próbki (*Carry over*)

Zjawisko przeniesienia próbki to niepożądane zanieczyszczenie próbki poddawanej analizie substancją znajdującą się w pętli autosamplera, pochodzącą z poprzednio analizowanej próbki. W badaniu wykorzystuje się roztwór wzorcowy oraz roztwór, w którym próbki nanoszone są na kolumnę chromatograficzną. Roztwór wzorcowy zawiera substancję badaną oraz wzorec wewnętrzny w stężeniach odpowiadających najwyższym oznaczanym stężeniom substancji badanej oraz użytemu w badaniu stężeniu IS. Należy również uwzględnić ewentualne zatężenie próbki podczas jej przygotowywania do analizy. Próbkę obu roztworów analizowane są naprzemiennie w jednej

sekwencji. Na chromatogramach uzyskanych po podaniu do kolumny roztworu niezawierającego substancji badanych nie mogą pojawić się piki, które mogłyby wpłynąć na ilościowe oznaczenie związku badanego.

Walidacja w trakcie badania

W celu potwierdzenia wiarygodności wyników, uzyskiwanych za pomocą zwalidowanej metody, w czasie rutynowej analizy prowadzi się walidację w trakcie badania. Monitorowanie metody jest możliwe dzięki odpowiednio skonstruowanej sekwencji analitycznej, w skład której powinny wchodzić: test zgodności (SST – *System Suitability Test*), próbki kalibracyjne, próbki badane oraz próbki kontrolne (QC – *Quality Control sample*).

Test zgodności (SST – *System Suitability Test*)

Test zgodności powinien być przeprowadzany codziennie przed rozpoczęciem analiz i/lub po ich zakończeniu. Jego celem jest sprawdzenie, czy cały system (np. HPLC lub LC–MS) pracuje w warunkach zwalidowanych i czy jest zdolny dostarczyć wiarygodne wyniki. Roztwór wzorcowy do SST powinien zawierać wszystkie substancje, które są w próbkach badanych oznaczane, np. lek, metabolit i wzorzec wewnętrzny. Stężenie takiego roztworu z reguły jest wysokie i wynosi przynajmniej 80% najwyższego stężenia na krzywej kalibracyjnej. W sytuacji gdy oceniany jest stosunek sygnału do szumu, zalecane są dodatkowe analizy próbek o niskim stężeniu (na poziomie LLOQ). Parametrami ocenianymi w trakcie przeprowadzania testów zgodności mogą być podstawowe parametry charakteryzujące proces chromatograficzny, m.in. precyzja, rozdzielczość, stosunek sygnału do szumu, współczynnik ogonowania, liczba pól teoretycznych oraz całkowity czas retencji.

Precyzja została zdefiniowana w części „Walidacja przed rozpoczęciem analizy próbek badanych”. Parametr rozdzielczość określa stopień rozdzielenia piku analizowanej substancji od najbliższego mu piku, np. zanieczyszczenia, produktu rozpadu lub wzorca wewnętrznego. Z kolei stosunek sygnału do szumu wskazuje, jaki wpływ na oznaczenie ilościowe ma niestabilność linii podstawowej w pobliżu czasu retencji substancji badanej. Współczynnik ogonowania pozwala określić asymetrię piku chromatograficznego, natomiast liczba pól teoretycznych służy do oceny sprawności kolumny chromatograficznej. Pojęcie całkowitego czasu retencji substancji chemicznej określa czas od podania roztworu do kolumny chromatograficznej, do momentu pojawienia się na chromatogramie maksimum piku, odpowiadającego oznaczanej substancji.

Przed przystąpieniem do analizy należy ustalić jakie parametry (przynajmniej dwa) są wymagane do przeprowadzenia testów zgodności dla danej metody. Kryteria akceptacji dla SST są określone indywidualnie

dla każdej metody bioanalitycznej na podstawie wyników uzyskanych podczas jej opracowywania, ale nie powinny przekraczać wartości granicznych regulowanych przez międzynarodowe wytyczne [9].

Krzywa kalibracyjna

Krzywa kalibracyjna służy do obliczania stężenia substancji badanej w próbkach badanych i próbkach kontrolnych. Jak wspomniano wcześniej, krzywa jest przygotowywana dla każdego badanego związku. Wartości stężeń substancji badanych są odczytywane z krzywej kalibracyjnej z danej sekwencji analitycznej. Nie jest dopuszczalne ekstrapolowanie krzywej poniżej dolnej granicy oznaczalności, dlatego wyniki oznaczeń poniżej LLOQ należy określić jako „<LLOQ”. Natomiast próbki badane o stężeniu powyżej zakresu krzywej należy, po rozcieńczeniu materiałem biologicznym, analizować powtórnie. Zgodnie z wytycznymi krzywa kalibracyjna spełnia kryteria akceptacji, jeżeli 75% próbek kalibracyjnych zostało oznaczonych z akceptowalną dokładnością. W uzasadnionych przypadkach dopuszczalne jest analizowanie dwóch krzywych kalibracyjnych podczas jednej sekwencji.

Próbki kontrolne (QC – *Quality Control sample*)

Próbki kontrolne (QC) służą do monitorowania dokładności i precyzji w trakcie prowadzenia badania. Przygotowuje się je przed przystąpieniem do badań, w sposób analogiczny do przygotowania próbek kalibracyjnych, w minimum trzech stężeniach z zakresu krzywej kalibracyjnej. Do czasu wykonania oznaczeń wszystkie próbki kontrolne należy przechowywać w takich samych warunkach jak próbki badane. Rozmieszczenie próbek QC w sekwencji analitycznej powinno być równomierne. Muszą one stanowić co najmniej 5% próbek badanych. Wartości stężeń roztworów kontrolnych są odczytywane z krzywej kalibracyjnej, analizowanej w danym dniu, i stanowią podstawę do zatwierdzenia lub odrzucenia wyników całej sekwencji analitycznej. Sekwencja analityczna spełnia kryteria akceptacji, jeżeli co najmniej 67% wyników dla próbek QC charakteryzuje się wymaganą dokładnością, a wyniki niespełniające tych wymagań nie są próbkami o tym samym stężeniu. Jeżeli wyniki próbek QC w sekwencji nie spełniają ustalonych kryteriów akceptacji, wszystkie wyniki z tej sekwencji należy odrzucić, a próbki analizować powtórnie. Należy pamiętać, że

W zależności od zakresu przeprowadzonych doświadczeń wyróżnia się walidację pełną lub częściową. Walidacja pełna jest wymagana, gdy metoda jest opracowywana lub wdrażana po raz pierwszy oraz w przypadku rozszerzenia istniejącej metody oznaczania substancji leczniczej o analizę ilościową metabolitów. Walidacja częściowa jest przeprowadzana, gdy w opracowanej i zwalidowanej metodzie wprowadzane są zmiany. Zaliczamy do nich: przeniesienie metody między laboratoriami, zmianę metodologii bioanalitycznej (np. zmiana rodzaju detekcji, zmianę sposobu przygotowania próbki do analizy), zakresu stężeń, aparatów pomiarowych i ich oprogramowania, zmianę selektywności ze względu na obecność w próbce nowych substancji lub metabolitów.

w przypadku oznaczania dwóch związków odrzucenie sekwencji analitycznej z powodu niespełnienia kryteriów dla jednego z nich, nie unieważnia wyników oznaczenia drugiego związku.

Zakres walidacji

Każda nowa, dotychczas niestosowana, bądź też zmieniona metoda bioanalityczna wymaga walidacji. W zależności od zakresu przeprowadzonych doświadczeń wyróżnia się walidację pełną lub częściową.

Walidacja pełna jest wymagana, gdy metoda jest opracowywana lub wdrażana po raz pierwszy oraz w przypadku rozszerzenia istniejącej metody oznaczania substancji leczniczej o analizę ilościową metabolitów. Przed przystąpieniem do analizy próbek badanych, należy określić wszystkie wymienione wcześniej parametry walidacyjne. W razie konieczności walidację należy uzupełnić o test rozcieńczania, w którym ocenia się, jak rozcieńczanie próbek o stężeniach spoza zakresu krzywej wpływa na dokładność i precyzję oznaczeń.

Walidacja częściowa jest przeprowadzana, gdy w opracowanej i zwalidowanej metodzie wprowadzane są zmiany. Zaliczamy do nich: przeniesienie metody między laboratoriami, zmianę metodologii bioanalitycznej (np. zmiana rodzaju detekcji, zmianę sposobu przygotowania próbki do analizy), zakresu stężeń, aparatów pomiarowych i ich oprogramowania, zmianę selektywności ze względu na obecność w próbce nowych substancji lub metabolitów. Walidację częściową należy również przeprowadzić, gdy metoda nie była stosowana przez dłuższy czas, np. przez pół roku. W ramach walidacji częściowej określa się przede wszystkim precyzję, dokładność, LLOQ i liniowość. W zależności od charakteru zmian, konieczne może być również oznaczenie innych parametrów walidacyjnych i wówczas walidacja częściowa jest bliska walidacji pełnej.

Podsumowanie

Krytyczne znaczenie wiarygodności wyników badań farmakokinetycznych dla zapewnienia bezpieczeństwa i skuteczności terapii, zostało dostrzeżone przez agencje rejestracyjne pod koniec XX wieku. Amerykańska Agencja ds. Żywności i Leków (FDA – *Food and Drug Administration*) zorganizowała pierwszy panel dyskusyjny dla przedstawicieli administracji rządowej i środowisk naukowych, dotyczący walidacji metod bioanalitycznych, już w 1990 roku [10]. Następnie FDA wydała projekt dokumentu, który został poddany szerokim konsultacjom i w 2001 roku uzyskał status zatwierdzonych wytycznych.

Europejska Agencja Leków (EMA – *European Medicines Agency*) także dostrzegła konieczność

zapewnienia wiarygodności wyników badań farmakokinetycznych. Pod koniec 2008 roku został opublikowany przez Komisję ds. produktów leczniczych stosowanych u ludzi (CHMP – *European Committee for Medicinal Products For Human Use*) dokument dotyczący potrzeby sprecyzowania zasad wykonywania walidacji metod bioanalitycznych [11]. Uwzględniając czas potrzebny na przygotowanie projektu wytycznych europejskich i przeprowadzenie jego konsultacji społecznych, nie należy spodziewać się ich wprowadzenia wcześniej niż za 1–2 lata. Należy mieć nadzieję, że nowe wytyczne będą zgodne z wytycznymi FDA, które w chwili obecnej są uznawane przez europejskie urzędy rejestracji. Wprowadzenie różnych wymagań dotyczących walidacji metod bioanalitycznych w USA i w UE byłoby znaczącym utrudnieniem dla przemysłu farmaceutycznego, ponieważ mogłoby stanowić podstawę do kwestionowania przez EMA i FDA wyników badań równoważności biologicznej, wykonywanych odpowiednio w USA i UE. Dlatego, zdaniem autorów, projekt wytycznych powinien być od najwcześniejszych etapów konsultowany pomiędzy europejską i amerykańską agencją rejestracyjną. Umożliwiłoby to wypracowanie konsensusu i wprowadzenie jednolitych wytycznych obowiązujących na głównych rynkach światowych.

Otrzymano: 2009.08.19 · Zaakceptowano: 2009.08.29

Piśmiennictwo

1. Kobylńska K.: Badania równoważności biologicznej odtworzonych preparatów farmaceutycznych, *Przem. Chem.* 2002, 81: 311–313.
2. CPMP/EWP/QWP/1401/98, *Note for Guidance on the Investigation of Bioavailability and Bioequivalence*. Committee for Proprietary Medicinal Products (CPMP). London, July 2001.
3. *Guideline on the Investigation of Bioequivalence (Draft)*. European Medicines Agency (EMA). London, July 2008.
4. *Guidance for Industry. Bioanalytical Method Validation*. U.S. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Center for Veterinary Medicine (CVM). May 2001.
5. Rudzki P.J., Buś K.M., Ksycińska H., Kobylńska K.: Wpływ materiału biologicznego na oznaczanie substancji leczniczych i ich metabolitów za pomocą LC-MS. *Przem. Chem.* 2007, 86: 789–792.
6. Rudzki P.J., Leś A.: Application of confidence intervals to bioanalytical method validation – drug stability in biological matrix testing. *Acta Pol. Pharm.* 2008, 65(6): 743–747.
7. Kobylńska K., Buś K.M., Bukowska-Kliszek M.: A high-performance liquid chromatography with electrochemical detection for the determination of olanzapine in human plasma. *Acta Pol. Pharm.* 2008, 65(6): 759–762.
8. Stoller R.G., Myers C.E., Chabner B.A.: Analysis of cytidine deaminase and tetrahydrouridine interaction by use of ligand techniques. *Biochem. Pharmacol.* 1978, 27: 53–59.
9. Reviewer Guidance. Validation of Chromatographic Methods. Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research (CDER), November 1994
10. Shah V.P.: The History of Bioanalytical Method Validation and Regulation: Evolution of a Guidance Document on Bioanalytical Methods Validation. *The AAPS Journal.* 2007, 9(1): 43–47.
11. EMA/CHMP/EWP/531305/2008, *Concept paper/Recommendations on the need for a (CHMP) guideline on the validation of bioanalytical methods*. Committee for Medicinal Products For Human Use (CHMP). December 2008.