کنفرانس بین المللی هماهنگی نیاز های تکنیکی ثبت فراورده های دارویی برای مصرف انسانی

خط مشی سه جانبه هماهنگ *ICH*

معتبر سازی روش های آنالیزی :

کلیات و روش کار

Q2 (R1)

ترجمه : دکتر ال ناز تمیزی

زیر نظر: دکتر ابوالقاسم جویبان

نسخه چهارم

دستورالعمل اولیه ۲۷ نوامبر ۱۹۹۴

(دستورالعمل مکمل روش کار ۶ نوامبر ۱۹۹۶، بازنگری شده در نوامبر ۲۰۰۵)

بخش اول:

کلیات معتبر سازی روش های آنالیزی

دستورالعمل هماهنگ سه گانه *ICH*

۲۷ اکتبر ۱۹۹۴

معتبرسازی روش های آنالیزی

مقدمه:

در این بخش پارامتر هایی که برای معتبر سازی یک روش آنالیزی به عنوان بخشی از درخواست ثبت توسط EC ، ژاپن و آمریکا توصیه شده، مورد بحث قرار می گیرد. این بخش برای پوشش دادن تست هایی که برای ثبت دارو در داخل و یا صادرات دارو ست الزاما خواسته نشده است. به علاوه، این متن ارائه شده به عنوان مجموعه ای از اصطلاحات و تعریف آن ها بوده و هدف ارائه دستورالعمل چگونگی انجام معتبر سازی را ندارد. هدف از این اصطلاحات و تعریف آن ها، نزدیک کردن اختلاف نظر های موجود بین روش ها و قوانین مختلف موجود در EC ، ژاپن و آمریکا می باشد.

هدف از معتبر سازی یک روش آنالیزی نشان دادن این مطلب است که روش مورد بررسی برای هدف مورد نظر مناسب است. یک خلاصه فهرست وار از خصوصیات مورد بررسی در شناسایی، کنترل ناخالصی ها و تعیین مقدار را شامل می شوند. پروسه های آنالیزی دیگر هم در ضمیمه های بعدی این مطلب شرح داده می شوند.

انواع پروسه های آنالیزی که باید معتبر شوند:

مباحث این قسمت به طور معمول عمدتا برای معتبر سازی چهار پروسه آنالیتیکی به کار می روند:

۱- تست های شناسایی

۲- تست های کمی تعیین محتوای ناخالصی

۳- تست های محدودیت در کنترل ناخالصی ها

۴- تست های کمی تعیین مقدارماده موثره یا هر ماده انتخابی در ماده دارویی و یا فراورده دارویی

هرچند در متون اولیه معتبر سازی روش های آنالیزی اشاره ای به پروسه های آنالیزی دیگر مانند تست محلولیت فراورده های دارویی و یا تعیین اندازه ذره ای ماده موثره نشده است، ولی معتبر سازی این پروسه های آنالیتیکی نیز دارای اهمیتی معادل چهار روش ذکر شده در بالا بوده ودر نوشته های آینده به معتبر سازی این روش ها هم اشاره خواهد شد.

معتبرسازی روش های آنالیزی

تعریف مختصر انواع تست های گفته شده در بالا به قرار زیر می باشد:

- تست شناسایی برای اطمینان از ماهیت آنالیت در نمونه انجام می شود. این کار به طور معمول با مقایسه خصوصیات نمونه مثل طیف، رفتار ماده در کروماتوگرافی، فعالیت شیمیایی و غیره با خصوصیات رفرانس استاندارد انجام می شود.
- تست ناخالصی ها به هر دو صورت تست های کمی و تست های محدودیت در مقدار ناخالصی در نمونه ها می باشند. هر تست باید خصوصیات مربوط به خلوص ماده در نمونه را به طور صحیح منعکس کند. خصوصیات معتبر سازی مختلف برای تست های کمی تعیین مقدار نسبت به تست های محدودیت مقدار ناخالصی بیشتر مورد لزوم می باشد.
- پروسه های تعیین مقدار برای اندازه گیری مقدار آنالیت موجود در نمونه های معلوم به کار می رود. در این قسمت تعیین مقدار به مفهوم اندازه گیری کمی جز اصلی در ماده دارویی است. در فراورده دارویی برای تعیین مقدار ماده موثره یا هر ماده دیگر شاخص های معتبر سازی مشابهی به کار می رود. شاخص های معتبر سازی مشابهی هم برای تعیین مقدار های مرتبط با پروسه های آنالیزی دیگر مثل محلولیت به کار می رود.

هدف پروسه آنالیزی باید به روشنی مشخص شود، چراکه با دانستن این مطلب، شاخص هایی که باید برای معتبر سازی روش آنالیزی مورد ارزیابی قرار گیرند، تعیین خواهند شد. شاخص های معتبر سازی معمول که باید مورد بررسی قرار گبرند، عبارت اند از:

۱- صحت

۲- دقت

۱- تکرار پذیری

۲- دقت بینابینی

۳- تکثیر پذیری

۳- انتخابی و ویژه بودن

۴- حد تشخیص

۵- حد تعیین مقدار

۶- خطی بودن

۷- محدوده

در جدول ۱ شاخص های معتبر سازی که در انواع مختلف پروسه های آنالیزی از اهمیت زیادی برخوردارند، ذکر شده است. معمولا شاخص های موجود در این جدول برای معتبر سازی پروسه های آنالیزی مختلف به کار می روند، اما در مواردی هم ممکن است، استثناهایی اتفاق بیفتد.

باید به این نکته توجه داشت که استحکام روش در جدول موجود نیست، اما باید در مرحله نهایی توسعه پروسه آنالیزی مورد ارزیابی قرار گیرد.

به علاوه در موارد زیر انجام معتبر سازی مجدد ضروری است :

- تغییر در نحوه سنتز ماده دارویی
- تغییر در ترکیبات فراورده نهایی
- تغییر در پروسه آنالیزی

میزان معتبر سازی مجدد به ماهیت تغییرات بستگی دارد. علاوه بر موارد اشاره شده تغییرات دیگری هم ممکن است باعث نیاز به معتبر سازی مجددشوند.

معتبرسازی روش های آنالیزی

جدول ۱ – شاخص های معتبر سازی روش های آنالیز

تعیین مقدار	تست ناخالصی ها		شناسایی	نوع پروسه آنالیزی
- محلولیت (فقط اندازه گیری) - محتوا / فعالیت	محدودیت	تعیین مقدار		خصوصیات
+	–	+	–	صحت
+ +[1]	– –	+ +[1]	–	دقت : - تکرار پذیری - دقت بینابینی
+	+	+	+	انتخابی بودن[2]
–	+	–[3]	–	حد تشخیص
–	–	+	–	حد تعیین مقدار
+	–	+	–	خطی بودن
+	–	+	–	محدوده

- نشانگر خصوصیاتی است که به طور معمول مورد ارزیابی قرار نمی گیرند.

+ نشانگر خصوصیاتی است که به طور معمول مورد ازریابی قرار می گیرند.

۱ در این موارد زمانی که تکرار پذیری بررسی شود نیازی به بررسی دقت بینابینی نیست.

۲ عدم انتخابی بودن یک پروسه آنالیزی را می توان با دیگر پروسه های آنالیزی پشتیبان جبران کرد.

۳ در برخی موارد، مورد نیاز است.

واژه نامه :

۱- پروسه آنالیزی :

پروسه آنالیزی بیانگر روش انجام آنالیز می باشد، که باید جزئیات ضروری انجام هر آزمایش را شرح دهد. در این پروسه در مورد نمونه، رفرانس استاندارد و نحوه تهیه معرف ها، استفاده از دستگاه، رسم منحنی کالیبراسیون، استفاده از فرمول های محاسباتی و ... توضیحاتی داده می شود.

۲- انتخابی بودن :

انتخابی بودن یک روش آنالیزی، توانایی آن روش برای تشخیص واضح آنالیت در حضور ترکیباتی است، که احتمال حضور آن ها در نمونه می رود. از جمله این ترکیبات می توان ناخالصی ها، ترکیبات حاصل از تخریب آنالیت، اجزای ماتریکس و غیره را نام برد.

عدم انتخابی بودن یک پروسه آنالیزی خاص را می توان با دیگر پروسه های آنالیزی پشتیبان جبران کرد.

این تعریف مستلزم روشن شدن مفاهیم زیر می باشد :

شناسایی : اطمینان از ماهیت آنالیت

معتبرسازی روش های آنالیزی

تست های خلوص : اطمینان از اینکه تمام پروسه های آنالیزی که انجام می شوند، محتوای ناخالصی های یک آنالیت را به طور صحیح نشان می دهند مثل تست مواد وابسته، فلزات سنگین، مقدار حلال های باقیمانده و غیره.

تعیین مقدار (محتوا یا قدرت):

به دست آوردن نتایج دقیق و صحیح که نشان دهنده مقدار یا قدرت آنالیت در نمونه ها باشد.

۳- صحت :

صحت روش آنالیزی بیانگر نزدیکی بین مقدار صحیح قراردادی و یا مقدار مرجع پذیرفته شده و مقدار به دست آمده از روش آنالیزی است. این شاخص گاهی با اصطلاح درستی نیز بیان می شود.

۴- دقت :

دقت یک پروسه آنالیزی، بیانگر نزدیکی نتایج حاصل از اندازه گیری های متعدد یک نمونه هموژن تحت شرایط توصیه شده است. دقت در سه سطح تعریف می شود: تکرارپذیری، دقت بینابینی و تکثیر پذیری.

دقت باید با استفاده از نمونه های هموژن و معتبر محاسبه شود. هرچند، اگر به دست آوردن نمونه هموژن ممکن نباشد، این کار را می توان با نمونه های تهیه شده صناعی و یا محلول های نمونه انجام داد.

دقت یک پروسه آنالیزی معمولا به صورت واریانس، انحراف معیار ویا ثابت انحراف یک سری از اندازه گیری ها بیان می شود.

- تکرارپذیری:

تکرارپذیری بیانگر دقت تحت شرایط آزمایش در یک محدوده زمانی کوتاه است. تکرارپذیری با اصطلاح دقت حین تعیین مقدار نیزبیان می شود..

- دقت بینابینی:

معتبرسازی روش های آنالیزی

دقت بینابینی بیانگر تفاوت نتایج درون آزمایشگاهی بین روز های متفاوت، آنالیزکننده های متفاوت، تجهیزات آزمایشگاهی متفاوت وغیره است.

- تکثیر پذیری:

تکثیرپذیری بیانگر دقت نتایج بین آزمایشگاهی است. (مطالعات بین آزمایشگاهی که معمولا برای استاندارد کردن متد های آنالیزی به کار می رود.)

۵- حد تشخیص:

حد تشخیص یک روش آنالیزی عبارت است از کم ترین مقدار آنالیت قابل تشخیص موجود در نمونه که در حد تشخیص ضرورتی برای تعیین مقدار دقیق وجود ندارد.

۶- حد تعیین مقدار:

حد تعیین مقدار یک روش آنالیزی عبارت است از کم ترین مقدار آنالیت موجود در نمونه که با صحت و دقت مناسبی قابل تعیین مقدار باشد. حد تعیین مقدار یکی ازشاخص های مهم در تعیین مقدار کمی مقادیر کم ترکیبات موجود در ماتریکس نمونه بوده و به ویژه در تعیین مقدار ناخالصی ها و محصولات تجزیه ای کاربرد دارد.

۷- خطی بودن:

خطی بودن روش آنالیزی توانایی آن روش برای به دست آوردن نتایجی است که در یک محدوده مشخص دارای نسبت مستقیم با غلظت آنالیت در نمونه باشد.

معتبرسازی روش های آنالیزی

۸- محدوده:

محدوده یک روش آنالیزی عبارت است از فاصله بین بیشترین و کم ترین مقدار قابل اندازه گیری غلظت آنالیت موجود در نمونه که بیانگر سطح مناسب دقت، صحت و خطی بودن روش می باشد.

۹- استحکام روش:

استحکام یک روش آنالیزی ظرفیت آن روش برای بدون تغییر ماندن در اثر تغییرات کوچک اما عمدی در روش می باشد و بیانگر اعتبار روش در استفاده معمول از آن می باشد.

بخش دوم:

معتبر سازی روش های آنالیز: روش کار

دستورالعمل هماهنگ سه گانه *ICH*

۲۷ اکتبر ۱۹۹۴ بازنگری شده در نوامبر ۲۰۰۵

معتبرسازی روش های آنالیزی

مقدمه:

در این بخش پارامتر هایی که برای معتبر سازی روش های آنالیز باید بررسی شوند و در بخش اول ارائه شده اند به تفصیل مورد بررسی قرار می گیرد. هدف از این قسمت ارائه دستورالعمل و خط مشی برای چگونگی بررسی شاخص های مختلف معتبر سازی یک روش آنالیزی است. در برخی موارد مثل بررسی انتخابی و ویژه بودن روش ، توانایی کلی تعدادی از روش های آنالیزی با هم برای اطمینان از کیفیت ماده موثره و یا فراورده دارویی قابل بررسی است. بعلاوه این نوشته اطلاعات ضروری برای درخواست ثبت روش را هم فراهم می کند.

تمام داده های صحیح به دست آمده حین معتبر سازی روش آنالیز و فرمول هایی که برای محاسبه اعتبار شاخص های معتبر سازی به کار می روند باید به نحو مطلوب ثبت شده و مورد بحث قرار گیرند.

پروسه های دیگری به غیر از موارد ذکر شده در این دستورالعمل هم ممکن است قابل قبول و قابل اجرا باشند. انتخاب روش معتبر سازی مطلوب و شیوه اجرای آن بر عهده آزمایشگر است. این نکته را باید همیشه به خاطر داشت که هدف از معتبر سازی روش آنالیز اطمینان از مناسب بودن آن روش برای هدف خواسته شده است. به علت ماهیت پیچیده فراورده های بیولوژیک و بیوتکنولوژیک در برخی موارد روش به کار رفته برای این نمونه ها متفاوت از مطالب نوشته شده در این بخش می باشد.

برای مطالعات معتبر سازی باید از مواد مرجع با مشخصات معلوم و خلوص ثبت شده استفاده شود. درجه خلوص مورد نیاز بستگی به مورد مصرف آن ماده دارد.

برای روشن تر شدن مطلب، هر کدام از شاخص های معتبر سازی در یک بخش مجزا شرح داده می شود. نحوه تنظیم این قسمت منعکس کننده پروسه توسعه و معتبر سازی روش آنالیز است.

در عمل، معمولا امکان طراحی یک کار تجربی که بتوان به طور همزمان شاخص های مطلوب معتبر سازی را بررسی کرد واطلاعاتی راجع به توانایی کلی روش آنالیز به دست آورد، وجود دارد. برای مثال: انتخابی و ویژه بودن، خطی بودن، محدوده، صحت و دقت.

معتبرسازی روش های آنالیزی

۱- انتخابی و ویژه بودن:

این شاخص باید در حین معتبر سازی آزمایشات شناسایی، تعیین مقدار ناخالصی ها و تست تعیین مقدار ارزیابی گردد. روشی که برای نشان دادن ویژه بودن مورد استفاده قرار می گیرد به هدف مورد نظر روش آنالیزی بستگی دارد.

همیشه امکان نشان دادن اینکه یک روش آنالیزی برای یک آنالیت خاص انتخابی است وجود ندارد. (جداسازی کامل) در این موارد ترکیبی از دو یا تعداد بیشتری روش آنالیزی برای به دست آوردن حد جداسازی مطلوب توصیه می شود.

۱-۱- شناسایی

آزمایشات شناسایی مناسب، باید توانایی تفکیک بین دو ترکیب با ساختمان نزدیک را که احتمال حضورشان در یک نمونه می رود را داشته باشند. تفکیک روش را می توان از مقایسه نتایج مثبت حاصل از نمونه حاوی آنالیت با نتایج منفی حاصل از نمونه فاقد آنالیت به دست آورد. بعلاوه، تست شناسایی را می توان برای ترکیباتی با ساختمان مشابه یا خیلی نزدیک به هم برای نشان دادن عدم حصول پاسخ مثبت انجام داد. انتخاب ترکیباتی که ممکن است به طور بالقوه ایجاد مزاحمت و تداخل کنند، باید با دلایل علمی که بیانگر احتمال تداخل باشد، انجام گیرد.

۱-۲- تست تعیین مقدار و ناخالصی

برای کار های کروماتوگرافیک، برای ارزیابی انتخابی بودن روش باید کروماتوگرام های حاصله را به کار برد و هر ترکیب خاص باید کاملا مشخص شود. روش مشابهی هم برای بقیه روش های جداسازی باید به کار رود.

در کروماتوگرافی، جداسازی های بحرانی باید در یک سطح مطلوب در نظر گرفته شوند. برای جداسازی های بحرانی، ویژه بودن روش با حد تفکیک بین دو ترکیب که خیلی نزدیک به شسته می شوند بررسی می شود.

معتبرسازی روش های آنالیزی

در مواردی که یک روش تعیین مقدار غیر اختصاصی به کار رفته، باید از روش های آنالیزی پشتیبان دیگری برای نشان دادن ویژه بودن روش استفاده شود. به عنوان مثال وقتی که از روش تیتراسیون برای بررسی مقدار رهش ماده دارویی استفاده می شود، ترکیبی از تعیین مقدار و یک روش مطلوب برای آزمون ناخالصی ها باید به کار رود.

روش کار برای تعیین مقدار و آزمون ناخالصی ها مشابه بوده و به قرار زیر می باشد:

۱-۲-۱- ناخالصی ها در دسترس است.

برای تعیین مقدار، روش آنالیزی باید دارای توانایی جداسازی بین آنالیت و ناخالصی ها یا اکسیپیانت های محتمل باشد. به طور عملی این کار را می توان با افزودن مقدار مشخصی از آنالیت خالص به مقدار مشخصی از ناخالصی ها یا اکسیپیانت ها و تعیین مقدار آنالیت در حضور این عوامل مزاحم و نشان دادن عدم تاثیر پذیری نتیجه آنالیز از این ناخالصی ها انجام داد. (با مقایسه نتایج با نتیجه حاصل از نمونه فاقد آنالیت)

برای تست ناخالصی، جداسازی با افزودن مقدار مشخصی از ناخالصی مورد نظر به ماده موثره یا فراورده دارویی و بررسی امکان جداسازی این ناخالصی از هم یا سایر ترکیبات موجود در ماتریکس نمونه انجام می گیرد.

۲-۲-۱- ناخالصی ها در دسترس نیست.

اگر استاندارد مربوط به فراورده های حاصل از تخریب و یا ناخالصی ها در دسترس نبود، بررسی ویژه بودن روش با مقایسه نتایج حاصل از این روش با نتایج حاصل از یک روش آنالیزی معتبر با خصوصیات شناخته شده مثل روش های فارماکوپه ای و یا سایر روش های معتبر (روش های غیر وابسته) انجام می گیرد. به طور مطلوب، این کار باید شامل نگه داری نمونه ها در شرایط استرسی خاص: نور، حرارت، رطوبت، هیدرولیزاسیدی و بازی و اکسیداسیون باشد.

- برای تعیین مقدار، دو سری نتایج باید با هم مقایسه شوند.
- برای تست ناخالصی ها، شاخص های ناخالصی باید مورد مقایسه قرار گیرد.

آزمایشات خلوص پیک، برای نشان دادن اینکه پیک مربوطه فقط مربوط به پاسخ یک ترکیب است می تواند مفید باشد. (مثل *Diode array* یا طیف سنج جرمی)

۲- خطی بودن:

یک رابطه خطی باید در محدوده روش آنالیزی برقرار باشد. خطی بودن را می توان مستقیما برای ماده دارویی از طریق رقیق سازی های متوالی و یا از جداسازی اجزای یک ماتریکس سنتتیک از ترکیبات فراورده دارویی با استفاده از روش پیشنهادی نشان داد. که این کار را می توان در حین بررسی رنج مورد مطالعه قرار داد.

خطی بودن روش را باید با مشاهده یک رابطه خطی مشهود بین پاسخ در مقابل غلظت یا مقدار ارزیابی کرد. اگر یک رابطه خطی وجود داشته باشد، نتایج آزمایش را باید با روش ریاضی مناسب به دست آورد. برای مثال، با محاسبه خط رگرسیون با روش *Least Square*. در برخی موارد، برای به دست آوردن رابطه خطی بین تعیین مقدار و غلظت نمونه ها، نتایج آزمایش نیازمند یک سری تغییرات ریاضی برای آنالیز رگرسیون هستند. داده های حاصل از خط رگرسیون برای نشان دادن درجه خطی بودن می تواند مفید باشد.

ضریب رگرسیون، عرض از مبدا، شیب خط رگرسیون و جمع باقیمانده مربعات باید ثبت شده و رسم منحنی داده ها هم باید موجود باشد. بعلاوه، میزان انحراف داده های حقیقی با نتایج به دست آمده از منحنی کالیبراسیون هم می تواند برای نشان دادن درجه خطی بودن مفید باشد.

برخی از پروسه های آنالیزی، مانند ایمنواسی، بعد از انجام هیچ نوع تغییری خطی نمی شوند. در این موارد، باید بین پاسخ آنالیزی و غلظت یا مقدار آنالیت یک رابطه مناسب برقرار شود.

برای بررسی خطی بودن، حداقل ۵ غلظت توصیه شده است. روش های دیگرممکن باید تایید شوند.

۳- محدوده:

محدوده اختصاصی روش معمولا از مطالعات خطی بودن مشتق شده و به کاربرد مطلوب روش بستگی دارد. در صورتی که غلظت نمونه های مورد آنالیز در محدوده تعریف شده واقع شده باشند روش برای آن نمونه ها خطی بوده و دارای دقت و صحت مطلوبی است.

در موارد زیر باید کم ترین محدوده اختصاصی تعریف شود.

- در تعیین مقدار ماده موثره یا فراورده دارویی نهایی : معمولا در محدوده ۸۰ تا ۱۲۰ درصد غلظت مورد آزمایش
- در بررسی یکنواختی محتوا : ۷۰ تا ۱۳۰ درصد غلظت مورد آزمایش، به جز مواردی که بسته به ماهیت شکل دارویی محدوده مطلوب وسیع تری مورد نیاز باشد.
- برای تست انحلال : ۲۰± درصد بیشتر از محدوده اختصاصی

برای مثال، اگر یک فراورده دارویی آهسته رهش در ۱ ساعت ۲۰٪ و بعد از ۲۴ ساعت ۹۰٪ داروی خود را آزاد کند، محدوده معتبر در محدوده ۰٪ تا ۱۱۰٪ خواهد بود.

- برای تعیین مقدار ناخالصی ها : از سطح گزارش شده برای ناخالصی تا ۱۲۰ درصد ویژگی
- برای ناخالصی هایی که به صورت غیر طبیعی قوی بوده و یا دارای اثرات سمی یا اثرات فارماکولوژیک ناخواسته هستند، حد تشخیص / تعیین مقدار باید متناسب با سطحی باشد که ناخالصی باید در آن محدوده کنترل شود.

توجه : برای معتبر سازی روش های آزمون ناخالصی که در حین توسعه شکل دارویی انجام می گیرند، باید محدوده را در نزدیکی محدوده محتمل تعریف کرد.

- اگر تست تعیین مقدار و خلوص با هم به صورت یک آزمون انجام گرفته و فقط استاندارد ۱۰۰٪ به کار رفته باشد، محدوده خطی باید از سطح گزارش شده ناخالصی تا ۱۲۰٪ مقدار تعیین شده را پوشش دهد.

۴- صحت :

صحت باید در محدوده خطی اختصاصی روش آنالیزی برقرار باشد.

۴-۱- تعیین مقدار

۴-۱-۱- ماده موثره دارویی

روش های مختلفی برای تعیین صحت در اندازه گیری ماده موثره دارویی وجود دارد:

- به کار بردن روش آنالیزی برای آنالیت با خلوص مشخص (مثل مواد استاندارد)
- مقایسه نتایج حاصل از روش پیشنهادی با نتایج حاصل از یک روش معتبر که صحت آن مشخص و تعریف شده است.
- از صحت می توان به دقت، خطی بودن و ویژه بودن روش به کار رفته پی برد.

۴-۱-۲- فراورده دارویی

روش های مختلفی برای تعیین صحت در اندازه گیری فراورده دارویی وجود دارد :

- به کار بردن روش آنالیزی برای یک ماتریکس سنتتیک از اجزای فراورده دارویی که مقداری از ماده موثره که باید آنالیز شود به طور دستی به آن افزوده شده است.
- در مواردی که دسترسی به همه اجزای فراورده دارویی امکان پذیر نیست، می توان هم از افزودن مقدار مشخصی از آنالیت به فراورده دارویی و هم از مقایسه نتایج حاصل از روش پیشنهادی با یک روش معتبر یا خصوصیات مشخص که صحت آن معلوم و تعریف شده است، استفاده کرد.
- از صحت می توان به دقت، خطی بودن و ویژه بودن روش به کار رفته پی برد.

۴-۲- ناخالصی ها

صحت را باید با افزودن مقدار مشخصی از ناخالصی به ماده موثره یا فراورده دارویی به دست آورد.

در مواردی که به دست آوردن نمونه از ناخالصی های خاص و یا فراورده های حاصل از تخریب امکان پذیر نباشد، می توان از مقایسه نتایج حاصل از روش آنالیزی با نتایج حاصل از یک روش معتبر استفاده کرد. از فاکتور پاسخ ماده موثره دارویی می توان استفاده کرد.

در تمام موارد، چگونگی تعیین مقدار یک ناخالصی خاص یا مجموع ناخالصی ها در رابطه با آنالیت اصلی باید مشخص و واضح باشد، برای مثال به صورت وزنی وزنی و یا در صد سطح.

۴-۳- داده های توصیه شده

صحت را باید با حداقل ۹ تعیین مقدار در ۳ سطح از کم ترین غلظت های محدوده خطی به دست آورد. (یعنی ۳ غلظت از کمترین سطوح محدوده خطی را انتخاب و اندازه گیری هر کدام را ۳ بار توسط روش آنالیزی مورد نظرتکرار کرد.)

صحت را باید به صورت درصد بازیابی حاصل از اندازه گیری مقدار مشخصی از آنالیت موجود در نمونه و یا به صورت تفاوت بین مقدار میانگین حاصل از روش آنالیزی پیشنهادی و مقدار حقیقی پذیرفته شده با سطح اطمینان گزارش کرد.

۵- دقت

معتبر سازی روش آنالیزی برای تعیین مقدار و تعیین مقدار کمی ناخالصی ها شامل ارزیابی دقت روش هم می شود.

۵-۱- تکرار پذیری

تکرار پذیری را باید به روش زیر به دست آورد:

- حداقل ۹ تعیین مقدار در محدوده اختصاصی روش آنالیزی (در ۳ غلظت و هرکدام ۳ بار تکرار شود.)

- حداقل ۶ تعیین مقدار در ۱۰۰٪ غلظت مورد آزمایش

۵-۲- تکرار پذیری بینابینی

وسعت به کار گیری تکرار پذیری بینابینی بستگی به هدف مورد انتظار از روش آنالیزی دارد. فرد آزمایشگر باید تاثیر عوامل تصادفی را بر دقت روش آنالیزی مورد بررسی قرار دهد. تغییرات معمولی که باید مورد بررسی قرار گیرند، عبارت اند از : روز آزمایش، فرد آزمایشگر، تجهیزات و غیره، که بررسی تک تک این عوامل ضرورتا توصیه نشده است و استفاده از یک طرح تجربی مرجح می باشد.

۵-۳- تکثیر پذیری

تکثیر پذیری را می توان با یک آزمون بین آزمایشگاهی به دست آورد. تکثیر پذیری در پروسه استاندارد کردن روش آنالیزی، برای مثال برای وارد کردن یک روش آنالیزی به فارماکوپه، توصیه شده است. این داده ها بخشی از پرونده مجوز فروش نمی باشد.

۵-۴- داده های توصیه شده

انحراف معیار، انحراف معیار نسبی (ضریب تغییرات) و محدوده اطمینان باید برای هر نوع از دقت به دست آمده و گزارش شود.

۶- حد تشخیص

روش های مختلفی برای محاسبه حد تشخیص بسته به اینکه روش آنالیز دستگاهی است یا نه، امکان پذیر می باشد. علاوه بر روش های ذکر شده در پایین روش های دیگری هم ممکن است قابل قبول باشند.

۶-۱- بر پایه ارزیابی چشمی

این روش بیشتر برای آنالیز های غیر دستگاهی به کار می رود هرچند در برخی از روش های دستگاهی هم مورد استفاده دارد.

حد تشخیص را با آنالیز نمونه دارای غلظت مشخصی از آنالیت و به کار گیری کم ترین غلظتی که در آن بتوان نمونه را به طور صحیح تشخیص داد، به دست می آورند.

۲-۶-با استفاده از نسبت سیگنال به نویز

این روش را برای پروسه های آنالیزی که در آن ها نویز *Base line* قابل نمایش است، می توان به کار برد. محاسبه نسبت سیگنال به نویز با مقایسه سیگنال حاصل از نمونه دارای غلظت کم و معلوم از آنالیت با سیگنال حاصل از آنالیز نمونه بدون آنالیت و تعیین کمترین غلظتی که در آن تشخیص آنالیت به طور صحیح امکان پذیر باشد، انجام می گیرد. نسبت سیگنال به نویز ۳ یا ۲:۱ عموما برای حد تشخیص مورد قبول می باشد.

۳-۶- بر پایه انحراف معیار و شیب منحنی کالیبراسیون

حد تشخیص را می توان به صورت زیر نمایش داد:

$$DL = 3.3\,\sigma / S$$

که در آن σ انحراف معیار پاسخ و S شیب منحنی کالیبراسیون می باشد.

S را می توان با رسم منحنی کالیبراسیون برای آنالیت به دست آورد. محاسبه σ را می توان با روش های متعددی انجام داد. برای مثال:

۱-۳-۶- با استفاده از انحراف معیار نمونه فاقد آنالیت

اندازه گیری پاسخ زمینه ای را می توان با استفاده از آنالیز تعداد مناسبی از نمونه های فاقد آنالیت و محاسبه انحراف معیار نتایج این آنالیز ها انجام داد.

۲-۳-۶- با استفاده از منحنی کالیبراسیون

منحنی کالیبراسیون اختصاصی باید با استفاده از نمونه هایی حاوی آنالیت در محدوده حد تشخیص مورد بررسی قرار گیرد. انحراف معیار باقیمانده منحنی رگرسیون یا انحراف معیار عرض از مبدا منحنی رگرسیون می تواند برای محاسبه انحراف معیار به کار رود.

۶-۴- داده های توصیه شده

حد تشخیص و روش به کار رفته برای به دست آوردن حد تشخیص باید ارائه شود. اگر حد تشخیص با استفاده از روش چشمی و یا روش سیگنال به نویز به دست آمده، ارائه کروماتوگرام های حاصله برای ارزیابی نتایج، مورد قبول می باشد.

در مواردی که حد تشخیص با روش محاسباتی یا از طریق برون یابی به دست می آید، این نتایج را می توان با آنالیز تعداد مناسبی نمونه یا غلظت نزدیک به حد تشخیص معتبر کرد.

۷- حد تعیین مقدار

روش های مختلفی برای محاسبه حد تعیین مقدار بسته به اینکه روش آنالیز دستگاهی است یا نه، امکان پذیر می باشد. علاوه بر روش های ذکر شده در پایین روش های دیگری هم ممکن است مورد قبول باشد.

۷-۱- بر پایه ارزیابی چشمی

این روش بیشتر برای روش های غیر دستگاهی به کار می رود هرچند در برخی از روش های دستگاهی هم مورد استفاده قرار می گیرد.

حد تعیین مقدار را عموما با آنالیز نمونه دارای غلظت مشخصی از آنالیت و به کار گیری کم ترین غلظتی که در آن بتوان نمونه را به طور صحیح تعیین مقدارکرد، بررسی می کنند.

۶-۲- با استفاده از نسبت سیگنال به نویز

این روش را برای پروسه های آنالیزی که در آن ها نویز *Base line* قابل نمایش است، می توان به کار برد.

محاسبه نسبت سیگنال به نویز با مقایسه سیگنال حاصل از نمونه دارای غلظت کم و معلوم از آنالیت با سیگنال حاصل از آنالیز نمونه بدون آنالیت و تعیین کمترین غلظتی که در آن تعیین مقدار آنالیت به طور صحیح امکان پذیر باشد، انجام می گیرد. نسبت سیگنال به نویز ۱۰:۱ عموما برای حد تعیین مقدار مورد قبول می باشد.

۶-۳- با استفاده از انحراف معیار و شیب منحنی کالیبراسیون

حد تعیین مقدار را می توان به صورت زیر نمایش داد:

$$DL = 10\,\sigma / S$$

که در آن σ انحراف معیار پاسخ و S شیب منحنی کالیبراسیون می باشد.

S را می توان با رسم منحنی کالیبراسیون برای آنالیت به دست آورد. محاسبه σ را می توان با روش های متعددی انجام داد. برای مثال:

۶-۳-۱- با استفاده از انحراف معیار نمونه فاقد آنالیت

اندازه گیری پاسخ زمینه ای را می توان با استفاده از آنالیز تعداد مناسبی از نمونه های فاقد آنالیت و محاسبه انحراف معیار نتایج این آنالیز ها انجام داد.

۶-۳-۲- با استفاده از منحنی کالیبراسیون

منحنی کالیبراسیون اختصاصی باید با استفاده از نمونه هایی حاوی آنالیت در محدوده غلظتی حد تعیین مقدار مورد بررسی قرار گیرد. انحراف معیار باقیمانده منحنی رگرسیون یا انحراف معیار عرض از مبدا منحنی رگرسیون می تواند برای محاسبه انحراف معیار به کار رود.

۶-۴- داده های توصیه شده

حد تعیین مقدار و روش به کار رفته برای به دست آوردن حد تعیین مقدار باید ارائه شود. در مواردی که حد تعیین مقدار را می توان با آنالیز تعداد مناسبی نمونه یا غلظت نزدیک به حد تعیین مقدار معتبر کرد.

۷- استحکام روش

ارزیابی استحکام روش باید در حین توسعه فاز انجام گرفته و به نوع پروسه تحت بررسی بستگی دارد. در این بررسی باید صحت و دقت آنالیز با اعمال تغییرات عمدی در پارامتر های روش بدون تغییر باقی بماند.

اگر روش آنالیز مستعد تغییر در اثر تغییرشرایط آنالیزی باشد، این شرایط باید به طور مناسب کنترل شده و یا پروسه آنالیزی شامل یک سری توضیحات پیشگیرانه باشد. یک هدف از ارزیابی استحکام روش باید این باشد که

معتبرسازی روش های آنالیزی

یک سری از پارامتر های تناسب سیستم مثل آزمون حد تفکیک برای اطمینان از اعتبار روش آنالیزی در حین استفاده از آن روش به کار روند.

نمونه هایی از تغییرات معمول به قرار زیر می باشد:

- پایداری محلول های آنالیزی
- زمان استخراج

در مورد کروماتوگرافی مایع، نمونه هایی از تغییرات معمول به قرار زیر می باشد :

- تغییرات pH فاز متحرک
- تغییر در اجزای فاز متحرک
- ستون های متفاوت
- دما
- سرعت جریان

در مورد کروماتوگرافی گازی، نمونه هایی از تغییرات معمول به قرار زیر می باشد :

- ستون های متفاوت
- دما
- سرعت جریان

۹- آزمون تناسب سیستم

آزمون تناسب سیستم یک بخش کامل در بسیاری از پروسه های آنالیزی است. این آزمایش ها با این فرضیه انجام می شوند که، تجهیزات، اجزای الکترونیکی، دستورالعمل های آنالیزی و نمونه هایی که باید آنالیز شوند، یک سیستم کامل را تشکیل می دهند که قابل ارزیابی است. پارامتر های آزمون تناسب سیستم که برای یک

معتبرسازی روش های آنالیزی

پروسه آنالیزی خاص باید به کار روند، بستگی به نوع پروسه ای دارد، که باید معتبر شود. برای اطلاعات تکمیلی به فارماکوپه مراجعه شود.