

ΟΛΙΣΤΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ ΤΗΣ ΑΒΕΒΑΙΟΤΗΤΑΣ ΜΕΤΡΗΣΗΣ: Η ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΤΟΥ ΠΟΣΟΤΙΚΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΟΥ ΔΡΑΣΤΙΚΟΥ ΣΥΣΤΑΤΙΚΟΥ

ΒΑΣΙΛΗΣ ΒΙΟΛΑΚΗΣ¹, ΕΜΜΑΝΟΥΗΛ ΚΑΒΑΛΛΙΕΡΑΚΗΣ²

¹ΕΟΦ-ΔΙΕΥΘΥΝΣΗ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΩΝ-ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΧΗΜΙΚΩΝ ΑΝΑΛΥΣΕΩΝ
ΦΑΡΜΑΚΩΝ, ΜΕΣΟΓΕΙΩΝ 284 ΤΚ 15562 ΧΟΛΑΡΓΟΣ

²ΕΟΦ-ΔΙΕΥΘΥΝΣΗ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΩΝ, ΜΕΣΟΓΕΙΩΝ 284 ΤΚ 15562 ΧΟΛΑΡΓΟΣ
e-mail: vviolakis@eof.gr

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η αναλυτική προσέγγιση (*step-by-step*) κατά τον προσδιορισμό της αβεβαιότητας μέτρησης, αν και ευρέως καθιερωμένη και κατά κανόνα απαραίτητη, δεν αποτελεί εύχρηστο εργαλείο στην περίπτωση αναλυτικών εργαστηρίων με ευέλικτο αντικείμενο (εφαρμογή εκατοντάδων μεθόδων για τον προσδιορισμό διαφόρων αναλυτών σε διάφορα φαρμακευτικά προϊόντα – διαφορετική σύνθεση, περιεκτικότητα, μορφή). Αντιθέτως, η ολιστική (*overall*) προσέγγιση κατά την εκτίμηση της αβεβαιότητας βάσει στοιχείων από εσωτερικούς ελέγχους ποιότητας, από την επικύρωση της μεθόδου (*method validation*) αλλά και από διεργαστηριακούς ελέγχους είναι εξαιρετικά εύχρηστη και αποτελεσματική. Στο Εργαστήριο Χημικών Αναλύσεων Φαρμάκων του ΕΟΦ εφαρμόζονται εναλλακτικά κριτήρια αξιολόγησης των εργαστηριακών αποτελεσμάτων που βασίζονται στην εκτίμηση της αβεβαιότητας μέτρησης σύμφωνα με την επαναληψιμότητα που προκύπτει από σειρά αυτοτελών προσδιορισμών. Για την εύκολη και αξιόπιστη εφαρμογή των κριτηρίων έχουν αναπτυχθεί από το Εργαστήριο κατάλληλα υπολογιστικά προγράμματα. Στην παρούσα ανακοίνωση περιγράφονται γενικά τα εφαρμοζόμενα κριτήρια, και παρουσιάζονται στατιστικά στοιχεία που αφορούν την εφαρμογή των κριτηρίων, καθώς και τη συνήθη αβεβαιότητα κατά την εφαρμογή φυσικοχημικών τεχνικών (HPLC, φασματοφωτομετρία UV, ογκομέτρηση) ποσοτικού προσδιορισμού δραστικών συστατικών σε φαρμακευτικές πρώτες ύλες και σε φαρμακευτικά προϊόντα. Τα σχετικά αποτελέσματα επιβεβαιώνουν τη δυνατότητα εφαρμογής του συγκεκριμένου τρόπου αξιολόγησης των εργαστηριακών αποτελεσμάτων στο πλαίσιο διασφάλισης της ποιότητας των φαρμάκων.

Keywords: μέτρηση, αβεβαιότητα, overall approach, RSD.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ-ΟΡΙΣΜΟΙ

Η εκτέλεση ποσοτικών εργαστηριακών δοκιμών αποσκοπεί στην εκτίμηση της πραγματικής τιμής της μετρούμενης μεταβλητής (διάστημα εμπιστοσύνης) με δεδομένο βαθμό βεβαιότητας (επίπεδο εμπιστοσύνης). Η πραγματική τιμή της μετρούμενης μεταβλητής (εν προκειμένω περιεκτικότητα σε φαρμακευτικώς δραστικό συστατικό – εφεξής δραστικό συστατικό) είναι έννοια που υφίσταται μόνο θεωρητικά και συνεπώς η ακριβής μέτρησή της είναι αδύνατο να πραγματοποιηθεί πρακτικά.

Για να εκτιμηθεί η πραγματική τιμή της μετρούμενης μεταβλητής υπολογίζεται ο μέσος όρος σειράς μετρήσεων και στη συνέχεια αξιολογείται η αξιοπιστία του μέσου όρου με εκτίμηση της αβεβαιότητας μέτρησης.

Διακρίνονται δύο τύποι αβεβαιότητας [1]:

- η **αβεβαιότητα τύπου A** (u_A , είναι αυτή που ποσοτικοποιείται μέσω της τυπικής απόκλισης των επαναλαμβανόμενων προσδιορισμών) και
- η **αβεβαιότητα τύπου B** (u_B , είναι αυτή που ποσοτικοποιείται συνδυάζοντας υπολογιστικά τις επιμέρους συνιστώσες της αβεβαιότητας και όχι μέσω της τυπικής απόκλισης).

Η αβεβαιότητα τύπου B για τον ποσοτικό προσδιορισμό δραστικού συστατικού, περιλαμβάνει, ανάλογα με τη χρησιμοποιούμενη μέθοδο, τις αβεβαιότητες από όλα τα χρησιμοποιούμενα όργανα και σκεύη μέτρησης (αναλυτικός ζυγός, ογκομετρικές φιάλες, σιφόνια, ανιχνευτής, ολοκληρωτής κ.ο.κ.), τις οποίες καταρχήν οφείλει να παρέχει ο κατασκευαστής τους, τις αβεβαιότητες από τη χρονική ολίσθηση (time drift) από την αρχική βαθμονόμηση των οργάνων αυτών, τις αβεβαιότητες από την διακριτική ικανότητα των αναλογικών κυρίως οργάνων, τις αβεβαιότητες από συστηματική απόκλιση των περιβαλλοντικών συνθηκών (θερμοκρασία, σχετική υγρασία κ.ο.κ.), τις αβεβαιότητες των ονομαστικών τίτλων των χρησιμοποιούμενων χημικών ουσιών αναφοράς κ.τ.λ.

Ο αναλυτικός υπολογισμός των δύο επιμέρους συνιστωσών αβεβαιότητας (κατάρτιση *uncertainty budget*) και ο στατιστικός συνδυασμός τους για την εκτίμηση της συνολικής τυπικής και, εν συνεχεία, της *διευρυμένης αβεβαιότητας* αποτελούν την κλασική αναλυτική μεθοδολογική προσέγγιση (*step-by-step* ή *bottom-up approach*).

Οι επίσημες μέθοδοι της Ευρωπαϊκής Φαρμακοποιίας (αναφέρονται σε πρώτες ύλες), οι οποίες εφαρμόζονται από το Εργαστήριο Χημικών Αναλύσεων Φαρμάκων του ΕΟΦ, ενσωματώνουν στα επιτρεπτά όρια των προδιαγραφών τους (α) την αποδεκτή διακύμανση κατά τη φάση της παραγωγής, (β) την αποδεκτή αποσύνθεση της δραστικής ουσίας και (γ) τα συνήθη αναλυτικά σφάλματα (βλ. κεφ. 1.4 Ευρωπαϊκής/Ελληνικής Φαρμακοποιίας, [2], [3]). Αντίστοιχα ισχύουν για τις μονογραφίες φαρμακευτικών πρώτων υλών και προϊόντων που περιέχονται σε διάφορες Φαρμακοποιίες. Αλλά, και για τις μεθόδους που περιγράφονται στη φαρμακοχημική τεκμηρίωση της αίτησης εγκρίσεως κυκλοφορίας των φαρμακευτικών προϊόντων, όπως και για τις ανεπτυγμένες *in house* μεθόδους από τα εργαστήρια ελέγχου, είναι αρκετή η αναφορά στην αβεβαιότητα τύπου A (αρκεί να έχει προηγηθεί πλήρης επικύρωση –validation– των μεθόδων αυτών κατά τη φάση της ανάπτυξης τους προκειμένου να χρησιμοποιηθούν για συγκεκριμένο σκοπό - fitness for purpose) [8],[9], [12].

Ωστόσο, αναγκαίες προϋποθέσεις για την αποδοχή της συγκεκριμένης απλούστευσης στον υπολογισμό της αβεβαιότητας είναι αφενός η υιοθέτηση κατάλληλου συστήματος ποιότητας από το εργαστήριο ελέγχου (δηλαδή, τακτικός έλεγχος ζυγών και ογκομετρικών σκευών, χρήση χημικών ουσιών αναφοράς με αμελητέα ή καλά καθορισμένη αβεβαιότητα, τακτική βαθμονόμηση και έλεγχος καλής λειτουργίας των οργάνων, εξασφάλιση τεχνικής επάρκειας του προσωπικού, τακτικός έλεγχος εξουσιοδοτήσεων προσωπικού) και αφετέρου η σχολαστική ικανοποίηση των κριτηρίων ελέγχου καταλληλότητας του συστήματος (SST, System Suitability Test, π.χ. βλ. § 2.2.46 της Ευρωπαϊκής/Ελληνικής Φαρμακοποιίας για τα κριτήρια που εφαρμόζονται σε Τεχνικές Διαχωρισμού [2], [3]), τα οποία αποτελούν αναπόσπαστο τμήμα της μεθόδου, καθώς και των επιπλέον εσωτερικών κριτηρίων αποδοχής τα οποία εφαρμόζει γενικά το εργαστήριο ελέγχου [4].

Επομένως, υπό τις προαναφερθείσες προϋποθέσεις, εκτελείται ο υπολογισμός και η αναφορά μόνο της αβεβαιότητας τύπου A (*overall* ή *top-down approach*) [5]. Στην περίπτωση αυτή αξιοποιούμε δεδομένα από εσωτερικές διαδικασίες ελέγχου ποιότητας, από επικύρωση –validation– [6, 7, 8]/ επαλήθευση –verification– των μεθόδων, από

διεργαστηριακές μελέτες ή από δοκιμασίες ικανότητας (proficiency tests), δηλαδή συνδυασμούς συνιστωσών της αβεβαιότητας. Σε κάθε περίπτωση, η αναλυτική προσέγγιση για την εκτίμηση της αβεβαιότητας μέτρησης εξακολουθεί να είναι εξαιρετικά χρήσιμη σε ειδικές περιπτώσεις (π.χ. στον καθορισμό των ορίων προδιαγραφής ή στη διερεύνηση εκτός προδιαγραφών αποτελεσμάτων).

2. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΩΝ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

2.1 Ποσοτικός προσδιορισμός δραστικού συστατικού σε φαρμακευτικές πρώτες ύλες

Στην περίπτωση ποσοτικού προσδιορισμού δραστικού συστατικού σε φαρμακευτικές πρώτες ύλες, η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων με σκοπό την αποδοχή ή απόρριψη ενός δείγματος με βάση τα όρια των ισχυουσών προδιαγραφών γίνεται με χρησιμοποίηση κριτηρίου οδηγίων του Ευρωπαϊκού Δικτύου των Επισήμων Εργαστηρίων Ελέγχου Φαρμάκων (OMCL Net, Official Medicines Control Laboratories Network, EDQM-Council of Europe) για την εκτίμηση των αναλυτικών αποτελεσμάτων [9]. Το προτεινόμενο κριτήριο αξιολογεί την αβεβαιότητα τύπου Α εισάγοντας μια αυστηρή διαδικασία, κατά την οποία είναι δυνατό να απαιτηθούν μέχρι έξι (6) επαναληπτικοί προσδιορισμοί.

Αναλυτικά, η εφαρμοζόμενη διαδικασία έχει ως εξής:

(α) Εκτελούνται δύο προσδιορισμοί (ξεκινώντας από τη ζύγιση του δείγματος). Υπολογίζονται ο μέσος όρος x και η σχετική τυπική απόκλιση RSD_2 (Relative Standard Deviation %).

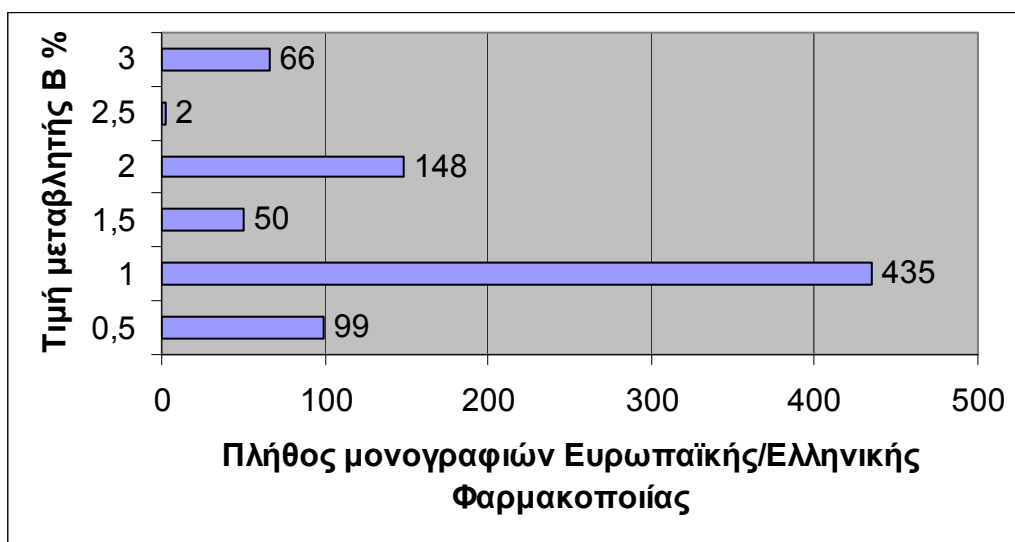
(β) Αν $RSD_2 \leq RSD_{\max,2}$ (μέγιστη επιτρεπτή σχετική τυπική απόκλιση για 2 προσδιορισμούς, βλ. σχετικά παρακάτω) και ο μέσος όρος x των δύο μετρήσεων βρίσκεται εντός των ορίων της προδιαγραφής, τα αποτελέσματα γίνονται δεκτά και το δείγμα χαρακτηρίζεται εντός προδιαγραφών.

(γ) Αν $RSD_2 > RSD_{\max,2}$ (μέγιστη επιτρεπτή σχετική τυπική απόκλιση) για 2 προσδιορισμούς και ο μέσος όρος x των δύο μετρήσεων βρίσκεται εκτός των ορίων της προδιαγραφής, τα αποτελέσματα γίνονται δεκτά και το δείγμα χαρακτηρίζεται εκτός προδιαγραφών. Ωστόσο, ανάλογα με την αξιολόγηση της απόστασης του μέσου όρου από τα όρια της προδιαγραφής, την εκτίμηση πιθανών αναλυτικών σφαλμάτων και δυσλειτουργιών-αστοχιών του εξοπλισμού ή του προσωπικού κ.ο.κ., μπορεί να αποφασιστεί η εκτέλεση ενός ακόμη προσδιορισμού (η διαδικασία επαναλαμβάνεται μέχρι 6 το πολύ προσδιορισμούς).

(δ) Αν $RSD_2 > RSD_{\max,2}$ για 2 προσδιορισμούς, εκτελείται ένας ακόμη προσδιορισμός και ελέγχεται η ικανοποίηση του κριτηρίου $RSD_3 < RSD_{\max,3}$ για 3 προσδιορισμούς. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται, εφόσον απαιτείται, μέχρι 6 το πολύ προσδιορισμούς. Αν εξακολουθεί $RSD_6 > RSD_{\max,6}$ για 6 προσδιορισμούς τερματίζεται η διαδικασία και εντοπίζονται-αντιμετωπίζονται τα αίτια της κακής επαναληψιμότητας.

(ε) Σε οποιοδήποτε στάδιο, αν $RSD_2 > USD_{\max,2}$, (ανώτατη επιτρεπτή σχετική τυπική απόκλιση, Ultimate Standard Deviation %), διακόπτεται η διαδικασία και εξετάζονται-αντιμετωπίζονται τα αίτια της κακής επαναληψιμότητας.

Είναι προφανές ότι κρίσιμης σημασίας ζήτημα για την εφαρμογή του κριτηρίου αποτελεί ο προσδιορισμός των τιμών RSD_{max} και USD_{max} για n επαναλήψεις (οι τιμές αυτές δίνονται σε σχετικούς πίνακες), ο οποίος βασίζεται στη δοκιμασία Student και εξαρτάται κατά κύριο λόγο από την τιμή μιας μεταβλητής B . Η μεταβλητή B αποτελεί μέτρο του αναμενόμενου σχετικού αναλυτικού σφάλματος (βλ. ορισμό *Repeatability* κεφ. 2.2.46 Ευρωπαϊκή/Ελληνική Φαρμακοποιία [2, 3]), όπως αυτό έχει προσδιοριστεί κατά την ανάπτυξη της μεθόδου ποσοτικού προσδιορισμού από τη διακύμανση διεργασηριακών (αναπαραγωγιμότητα) και ενδοεργασηριακών (επαναληψιμότητα) δοκιμών. Επομένως, στην περίπτωση που το ανώτερο όριο της προδιαγραφής έχει προσδιοριστεί βάσει μόνο του αναμενόμενου σχετικού αναλυτικού σφάλματος εφαρμόζεται η εξίσωση: $B = \text{ανώτερο όριο προδιαγραφής} - 100$. Γενικά, ως τιμή B λαμβάνεται η RSD όπως προκύπτει κατά την ανάπτυξη και επικύρωση της μεθόδου. Αν θεωρηθεί ότι πράγματι το ανώτερο όριο της προδιαγραφής έχει καθοριστεί αποκλειστικά και μόνο από το αναμενόμενο σύννηθες αναλυτικό σφάλμα τότε στο Σχήμα 1 φαίνεται η κατανομή των τιμών της μεταβλητής B όπως προκύπτει για 800 σχετικές μονογραφίες της Ευρωπαϊκής/Ελληνικής Φαρμακοποιίας [2, 3]. Η πλειονότητα των μονογραφιών αναφέρεται σε τιμή $B=1$ (ποσοστό 54%).



Σχήμα 1. Ενδεικτική κατανομή τιμών μεταβλητής B σε 800 μονογραφίες της Ευρωπαϊκής/Ελληνικής Φαρμακοποιίας

2.2 Ποσοτικός προσδιορισμός δραστικού συστατικού σε φαρμακευτικά προϊόντα

Στην περίπτωση ποσοτικού προσδιορισμού δραστικού συστατικού σε φαρμακευτικά προϊόντα, η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων με σκοπό την αποδοχή ή απόρριψη ενός δείγματος με βάση τα όρια των ισχυουσών προδιαγραφών γίνεται με χρησιμοποίηση ενός εκ των δύο εναλλακτικών κριτηρίων που αναφέρονται στη συνέχεια.

Κριτήριο Α. Το κριτήριο αυτό περιγράφεται σε οδηγίες του OMCL Net για την εκτίμηση των αναλυτικών αποτελεσμάτων [9]. Όπως και στην περίπτωση των πρώτων υλών, το προτεινόμενο κριτήριο αξιολογεί την αβεβαιότητα τύπου Α εισάγοντας μια αυστηρή

διαδικασία, κατά την οποία είναι δυνατό να απαιτηθούν μέχρι έξι (6) επαναληπτικοί προσδιορισμοί.

Αναλυτικά, η εφαρμοζόμενη διαδικασία έχει ως εξής:

(α) Εκτελούνται κατά προτίμηση 3 προσδιορισμοί (ή 2 προσδιορισμοί, μόνο σε ειδικές περιπτώσεις¹ και υπό την προϋπόθεση ότι εφαρμόζεται πλήρως επικυρωμένη –validated– αναλυτική μέθοδος και ότι πληρούνται σαφώς τα κριτήρια ελέγχου της καταλληλότητας του συστήματος) και ελέγχεται αν:
 $RSD_3 \leq 2RSD_{max,3}$ (βλ. § 2.1) και $\{ΚΟΠ^2+B\} \leq \text{μέσος όρος} \leq \{ΑΟΠ^3-B\}$,
σε θετική περίπτωση το δείγμα είναι εντός προδιαγραφών, διαφορετικά ελέγχεται αν:

$RSD_3 \leq RSD_{max,3}$ και $\{ΚΟΠ\} \leq \text{μέσος όρος} \leq \{ΑΟΠ\}$,

σε θετική περίπτωση το δείγμα είναι εντός προδιαγραφών,

(β) Αν $RSD_3 > 2RSD_{max,3}$ και $\{ΚΟΠ+B\} \leq \text{μέσος όρος} \leq \{ΑΟΠ-B\}$ και επιπλέον $RSD_3 > 2USD_3$, (βλ. § 2.1) ή

αν $RSD_3 > RSD_{max,3}$ χωρίς $\{ΚΟΠ+B\} \leq \text{μέσος όρος} \leq \{ΑΟΠ-B\}$ και επιπλέον $RSD_3 > USD_3$,

τότε ελέγχονται τα αίτια κακής επαναληψιμότητας,

(γ) Αν $RSD_3 > RSD_{max,3}$ και $\{ΚΟΠ\} \leq \text{μέσος όρος} \leq \{ΑΟΠ\}$ και $RSD_3 \leq USD_3$, ή

αν $RSD_3 > 2RSD_{max,3}$ και $\{ΚΟΠ+B\} \leq \text{μέσος όρος} \leq \{ΑΟΠ-B\}$ και επιπλέον $RSD_3 \leq 2USD_3$

τότε εκτελείται ένας ακόμη προσδιορισμός και επαναλαμβάνεται το στάδιο ελέγχου (α) (η διαδικασία επαναλαμβάνεται το πολύ μέχρι 6 συνολικά προσδιορισμούς),

(δ) Αν σε οποιοδήποτε στάδιο $RSD_i \leq RSD_{max,i}$ και δεν ικανοποιείται η σχέση

$\{ΚΟΠ\} \leq \text{μέσος όρος} \leq \{ΑΟΠ\}$

τότε το δείγμα κρίνεται ως εκτός προδιαγραφών.

Στην περίπτωση αυτή λαμβάνεται $B = [RSD \text{ από τη διαδικασία επικύρωσης της μεθόδου -method validation-}] \times 2$. Ωστόσο, η ακριβής τιμή της $[RSD \text{ από τη διαδικασία επικύρωσης της μεθόδου}]$ συνήθως δεν είναι γνωστή στον αναλυτή, πρέπει όμως να δίνεται στη φαρμακοχημική τεκμηρίωση της άδειας έγκρισης κυκλοφορίας του κάθε προϊόντος (συνήθως, σε ογκομετρικές ή χρωματογραφικές τεχνικές δεν είναι μεγαλύτερη του 1%, μόνο σε φασματοφωτομετρικές τεχνικές μπορεί να φθάνει το 2-3%). Αν δεν έχει προηγηθεί επικύρωση της μεθόδου ή αν τα σχετικά στοιχεία δεν είναι γνωστά, λαμβάνεται, ως πρώτη προσέγγιση $B = 2$ (αυστηρή παραδοχή) ή εκτελείται *in house* αναλυτική επικύρωση της μεθόδου με σκοπό τη διαπίστωση της ζητούμενης τιμής RSD .

Κριτήριο Β. Το κριτήριο αυτό περιγράφεται επίσης σε οδηγίες του OMCL Net για την εκτίμηση των αναλυτικών αποτελεσμάτων [9]. Το προτεινόμενο κριτήριο αξιολογεί

¹ Π.χ. όταν κατά την παραλαβή του δραστικού συστατικού ή την ανάλυση χρησιμοποιούνται επικίνδυνοι διαλύτες ή όταν υφίσταται ανεπαρκής ποσότητα του προς ανάλυση δείγματος, ή όταν πρόκειται περί ανάλυσης υπερβολικά μεγάλου αριθμού ομοίων προϊόντων (αντίστοιχης ποιοτικής και ποσοτικής σύστασης), ή όταν ο απαιτούμενος χρόνος ανάλυσης είναι απaráδεκτα μακρύς σε σχέση με την ανάγκη άμεσης απάντησης ή όταν παρουσιαστεί βλάβη του μετρητικού οργάνου ή όταν ο ποσοτικός προσδιορισμός δεν αποτελεί τον κύριο – κρίσιμο στόχο ελέγχου του προϊόντος.

² ΚΟΠ = Κάτω όριο Προδιαγραφής

³ ΑΟΠ = Άνω όριο Προδιαγραφής

επίσης την αβεβαιότητα τύπου A εισάγοντας μια σχετικώς ελαστική διαδικασία, κατά την οποία είναι δυνατό να απαιτηθούν μέχρι έξι (6) επαναληπτικοί προσδιορισμοί.

Αναλυτικά, η εφαρμοζόμενη διαδικασία έχει ως εξής:

(α) Εντοπίζονται στην επικύρωση της μεθόδου του ελεγχόμενου προϊόντος η επαναληψιμότητα $-RSD-$ (*repeatability*) της εφαρμοζόμενης αναλυτικής μεθόδου και οι βαθμοί ελευθερίας (συνήθως $d.f.=5$) με τους οποίους έχει προσδιοριστεί η επαναληψιμότητα αυτή.

(β) Εκτελούνται 3 προσδιορισμοί (ξεκινώντας από τη ζύγιση του δείγματος). Υπολογίζονται ο μέσος όρος x και η σχετική τυπική απόκλιση RSD_3 .

(γ) Αν $RSD_3 \leq RSD_{\max,3}$ για 3 προσδιορισμούς και ο μέσος όρος x των 3 μετρήσεων βρίσκεται εντός των ορίων της προδιαγραφής, τα αποτελέσματα γίνονται δεκτά και το δείγμα χαρακτηρίζεται εντός προδιαγραφών.

(γ) Αν $RSD_3 > RSD_{\max,3}$ για 3 προσδιορισμούς και ο μέσος όρος x των 3 μετρήσεων βρίσκεται εκτός των ορίων της προδιαγραφής, εκτελούνται κατά προτίμηση 3 (ή 2 ή 1) επιπλέον προσδιορισμοί και υπολογίζονται ο μέσος όρος x και η σχετική τυπική απόκλιση RSD_i των 6 (ή 5 ή 4 αντίστοιχα) προσδιορισμών.

(δ) Αν $RSD_6 \leq RSD_{\max,6}$ για 6 προσδιορισμούς και ο μέσος όρος x των 6 μετρήσεων βρίσκεται εκτός των ορίων της προδιαγραφής, υπολογίζεται το διάστημα εμπιστοσύνης του μέσου όρου από την εξίσωση:

$$x_6 \pm \frac{t_{90\%,n} \times \sigma_n}{\sqrt{6}}$$

όπου, $t_{90\%,n}$ είναι η κρίσιμη τιμή από τον Πίνακα τιμών της κατανομής Student για 90% *two-sided* επίπεδο εμπιστοσύνης και n το πλήθος των προσδιορισμών βάσει των οποίων υπολογίστηκε η τυπική απόκλιση (προκύπτει από την επικύρωση της μεθόδου) σ_n της αναλυτικής μεθόδου. Αν το διάστημα εμπιστοσύνης κείται εξ ολοκλήρου εκτός των ορίων της προδιαγραφής το δείγμα κρίνεται ως εκτός προδιαγραφών. Αν τμήμα του διαστήματος εμπιστοσύνης κείται εντός των ορίων της προδιαγραφής απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση.

(ε) Σε οποιοδήποτε στάδιο της διαδικασίας αν $RSD_i > RSD_{\max,i}$, η διαδικασία διακόπτεται και διενεργείται περαιτέρω διερεύνηση των αιτιών κακής επαναληψιμότητας.

Οι τιμές $RSD_{\max,i}$, με τη σειρά τους, εξαρτώνται κατά κύριο λόγο από την επαναληψιμότητα κατά την επικύρωση της αναλυτικής μεθόδου και από τους βαθμούς ελευθερίας ($d.f.=\text{πλήθος προσδιορισμών} - 1$) του προσδιορισμού που εκτελούμε (δηλ. $d.f.=2, 3, 4$ ή 5) και υπολογίζονται βάσει κρίσιμων τιμών F για *one-sided* έλεγχο (η δοκιμασία F ελέγχει τη στατιστική σημαντικότητα της διαφοράς 2 διακυμάνσεων-τυπικών αποκλίσεων βάσει του λόγου $F=s_1^2/s_2^2$, δηλ. εν προκειμένω ελέγχεται αν η επαναληψιμότητα των πειραματικών μας αποτελεσμάτων διαφέρει στατιστικώς σημαντικά από την επαναληψιμότητα κατά την επικύρωση της μεθόδου). Υπάρχουν διαθέσιμοι Πίνακες για $d.f.=5/10/20$ (βαθμοί ελευθερίας του προσδιορισμού της επαναληψιμότητας της μεθόδου) ανάλογα με τον πειραματικό σχεδιασμό της διαδικασίας επικύρωσης, ωστόσο συνήθως χρησιμοποιούνται οι τιμές του Πίνακα που αντιστοιχεί σε $d.f.=5$. Αν η επαναληψιμότητα από την επικύρωση της αναλυτικής μεθόδου δεν είναι

γνωστή λαμβάνεται κατά προσέγγιση η τιμή 1% για ογκομετρικές και χρωματογραφικές τεχνικές και 2% για φασματοφωτομετρικές.

2.3 Εναλλακτικές διαδικασίες αξιολόγησης εργαστηριακών αποτελεσμάτων

Σε κάθε περίπτωση, στο Εργαστήριο Χημικών Αναλύσεων Φαρμάκων του ΕΟΦ εφαρμόζεται διαδικασία για την έκφραση και την αξιολόγηση των εργαστηριακών αποτελεσμάτων διαφορετική από τις περιγραφόμενες προηγουμένως, μόνο όταν η επιλεγείσα διαδικασία έχει υποστεί επικύρωση με τη βοήθεια σειράς αναλυτικών δεδομένων (π.χ. συγκρίνοντάς την με άλλες επικυρωμένες διαδικασίες ή τεκμηριώνοντας την αξιοπιστία της μέσω διεργαστηριακών δοκιμών) και όταν ικανοποιούνται τα κριτήρια καταλληλότητας του συστήματος. Ορισμένες από αυτές τις εναλλακτικές διαδικασίες εκτίθενται στη συνέχεια [10]:

- (1) Εκτελούνται 3 προσδιορισμοί και υπολογίζονται τα αποτελέσματα με τη μέγιστη δυνατή ακρίβεια (συνήθως 0,01%). Αν και τα τρία αποτελέσματα είναι εντός των ορίων των προδιαγραφών, το δείγμα κρίνεται εντός προδιαγραφών. Αν δύο τουλάχιστον αποτελέσματα είναι εκτός των ορίων, το δείγμα κρίνεται εκτός προδιαγραφών. Αν μόνο ένα αποτέλεσμα είναι εκτός των ορίων των προδιαγραφών, τότε εκτελούνται 3 επιπλέον προσδιορισμοί. Αν κανένα από τα νέα αποτελέσματα δεν είναι εκτός των ορίων, το δείγμα κρίνεται εντός προδιαγραφών, αλλιώς κρίνεται εκτός προδιαγραφών.
- (2) Εκτελούνται κατά προτίμηση 3 προσδιορισμοί (ή 2 προσδιορισμοί μόνο όμως σε ειδικές περιπτώσεις¹) και υπολογίζεται ο μέσος όρος των αποτελεσμάτων τους. Αν ο μέσος όρος είναι εντός των ορίων, τότε το δείγμα κρίνεται εντός προδιαγραφών. Αν δεν είναι εντός των ορίων τότε εκτελούνται 3 (ή 2 αντίστοιχα) επιπλέον προσδιορισμοί και υπολογίζεται ο μέσος όρος των 6 (ή 4 αντίστοιχα). Αν ο νέος μέσος όρος είναι εντός των ορίων το δείγμα κρίνεται εντός προδιαγραφών, αλλιώς κρίνεται εκτός προδιαγραφών. Δεδομένης της μη συνεκτίμησης της διασποράς των αποτελεσμάτων, σημειώνεται, ότι η εφαρμογή του εν λόγω μοντέλου προϋποθέτει την ύπαρξη αξιόπιστων αποτελεσμάτων, η οποία αποδεικνύεται και με την αυστηρή ικανοποίηση των κριτηρίων καταλληλότητας του συστήματος.
- (3) Εκτελούνται κατά προτίμηση 3 προσδιορισμοί (ή 2 προσδιορισμοί μόνο όμως σε ειδικές περιπτώσεις¹) και υπολογίζεται ο μέσος όρος των αποτελεσμάτων τους και το διάστημα εμπιστοσύνης του μέσου όρου: $X = \bar{x} \pm u_A$, όπου $u_A = t \cdot s_x$ (γενικά είναι δυνατό να χρησιμοποιηθεί και η αβεβαιότητα που υπολογίστηκε βάσει της επαναληψιμότητας της μεθόδου όπως αυτή προκύπτει είτε από την επικύρωσή της, είτε από μεγάλη σειρά προσδιορισμών που πραγματοποιήθηκαν άπαξ στο παρελθόν με την ίδια μέθοδο, υπό την προϋπόθεση όμως ότι, εν τω μεταξύ, δεν έχει μεσολαβήσει σημαντική αλλαγή στο μετρητικό σύστημα ή στη διαδικασία μέτρησης η οποία θα μπορούσε να επηρεάσει την επαναληψιμότητα της μεθόδου [11]). Αν το διάστημα εμπιστοσύνης είναι εντός των ορίων, τότε το δείγμα κρίνεται εντός προδιαγραφών. Αν δεν είναι εντός των ορίων τότε εκτελούνται κατά προτίμηση 3 (ή 2) επιπλέον προσδιορισμοί και υπολογίζεται ο μέσος όρος και το διάστημα

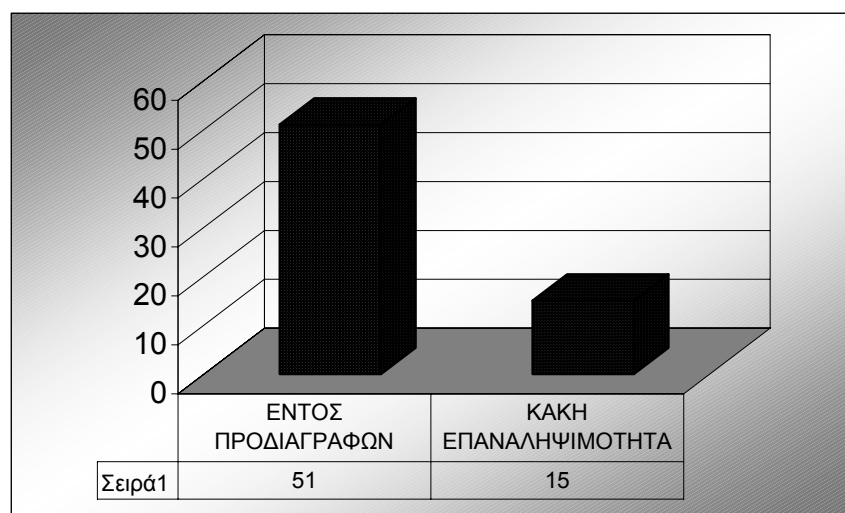
εμπιστοσύνης του μέσου όρου των 6 (ή 4). Αν το νέο διάστημα εμπιστοσύνης είναι εντός των ορίων το δείγμα κρίνεται εντός προδιαγραφών, αλλιώς κρίνεται εκτός προδιαγραφών.

Σε κάθε περίπτωση χαρακτηρισμού δείγματος εκτός προδιαγραφών διενεργείται τεκμηριωμένη έρευνα για τον εντοπισμό πιθανών τεχνικών σφαλμάτων στην εφαρμοσθείσα ανάλυση (π.χ. αποκλίσεις από τη μέθοδο, μέτρηση εκτός γραμμικής περιοχής, αγνόηση τιμής τυφλού, λανθασμένη αραίωση, χρήση ακατάλληλων προτύπων αναφοράς, διαλυτών ή αντιδραστηρίων, λανθασμένος χειρισμός ή υπολογισμός του αναλυτή, κακή λειτουργία εργαστηριακού εξοπλισμού, ακατάλληλη αποθήκευση του δείγματος κ.ο.κ.). Σε περίπτωση εντοπισμού τέτοιων σφαλμάτων η ανάλυση κρίνεται ως αναξιόπιστη, λαμβάνεται ειδική μέριμνα για την μελλοντική αποφυγή των διαπιστωθέντων σφαλμάτων και ο έλεγχος επαναλαμβάνεται εξ αρχής.

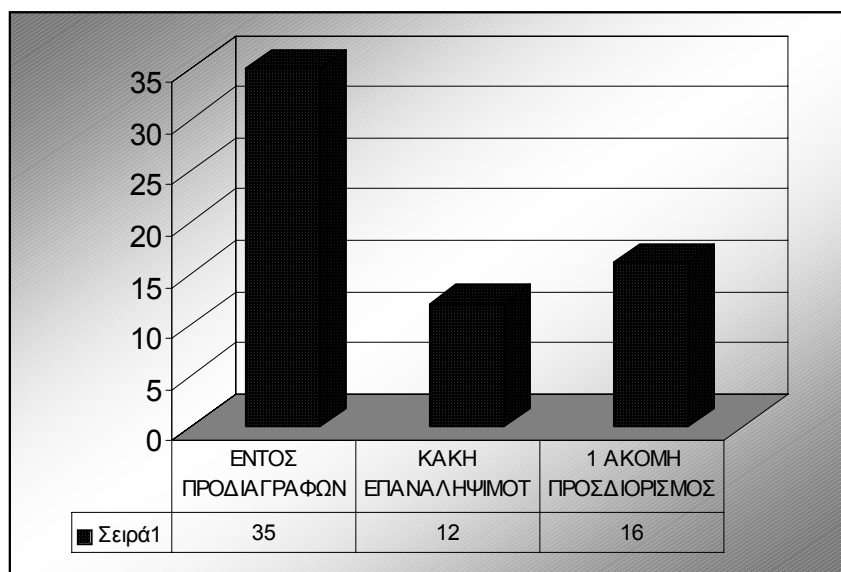
Εξάλλου, πριν από την εφαρμογή οποιουδήποτε κριτηρίου αξιολόγησης είναι δυνατή η απόρριψη απαράδεκτων τιμών (π.χ. με εφαρμογή της δοκιμασίας *Grubbs outlying means*). Ωστόσο, η πρακτική αυτή πρέπει να εφαρμόζεται με φειδώ και με ιδιαίτερη προσοχή, καθώς υποκρύπτει τον κίνδυνο στατιστικής απόρριψης αναλυτικά αποδεκτών τιμών ή συγκάλυψης κρίσιμων αναλυτικών σφαλμάτων.

3. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΠΟ ΤΗΝ ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΩΝ ΚΡΙΤΗΡΙΩΝ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ ΣΕ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ

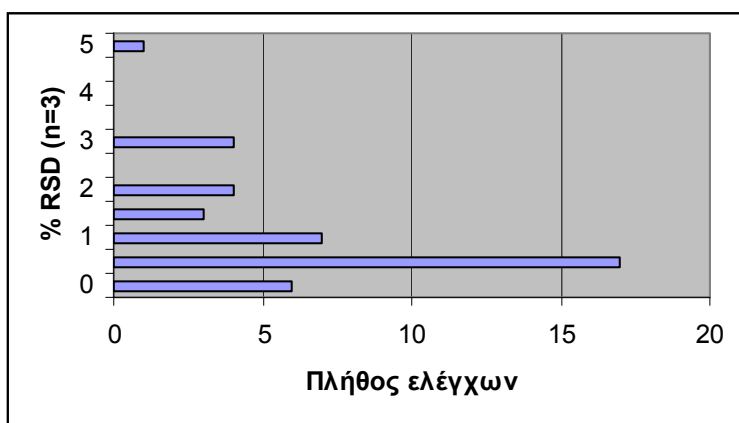
Η εφαρμογή των προαναφερθέντων κριτηρίων αξιολόγησης σε σειρά εργαστηριακών αποτελεσμάτων ποσοτικού προσδιορισμού δραστικού συστατικού σε φαρμακευτικά προϊόντα, τα οποία ελήφθησαν στο Εργαστήριο Χημικών Αναλύσεων Φαρμάκων του ΕΟΦ με εφαρμογή διαφόρων αναλυτικών τεχνικών (HPLC, φασματοφωτομετρία UV, ογκομέτρηση) και σύμφωνα με τις οδηγίες επίσημων ή εγκεκριμένων (και πάντως αναλυτικά επικυρωμένων) μεθόδων, συνοψίζονται στα Σχήματα που ακολουθούν (αναφέρονται σε 3 προσδιορισμούς ανά περίπτωση ελέγχου).



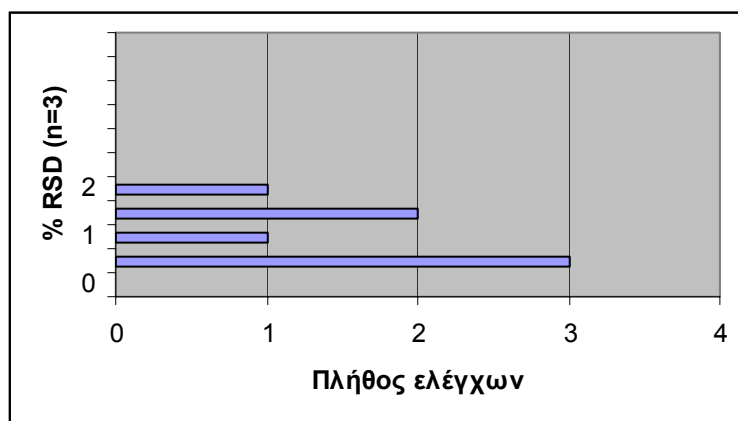
Σχήμα 2. Αξιολόγηση εργαστηριακών αποτελεσμάτων ποσοτικού προσδιορισμού δραστικού συστατικού σε φαρμακευτικά προϊόντα (τεχνικές HPLC, φασματοφωτομετρία UV) με εφαρμογή του Κριτηρίου Α



Σχήμα 3. Αξιολόγηση εργαστηριακών αποτελεσμάτων ποσοτικού προσδιορισμού δραστικού συστατικού σε φαρμακευτικά προϊόντα (τεχνικές HPLC, φασματοφωτομετρία UV) με εφαρμογή του Κριτηρίου B



Σχήμα 4. Κατανομή %RSD (στρογγυλοποίηση στην πλησιέστερη μισή μονάδα) εργαστηριακών αποτελεσμάτων ποσοτικού προσδιορισμού δραστικού συστατικού με HPLC σε 42 φαρμακευτικά προϊόντα (3 προσδιορισμοί ανά ελεγχόμενο προϊόν)



Σχήμα 5. Κατανομή %RSD (στρογγυλοποίηση στην πλησιέστερη μισή μονάδα) εργαστηριακών αποτελεσμάτων ποσοτικού προσδιορισμού δραστικού συστατικού με φασματοφωτομετρία UV σε 7 φαρμακευτικά προϊόντα (3 προσδιορισμοί ανά ελεγχόμενο προϊόν)

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η εφαρμογή των προαναφερθέντων κριτηρίων αξιολόγησης εργαστηριακών αποτελεσμάτων ποσοτικού προσδιορισμού δραστικού συστατικού σε φαρμακευτικές πρώτες ύλες και προϊόντα (§2.1 και §2.2.) παρέχει τη δυνατότητα αμερόληπτης διάκρισης μεταξύ των εξής περιπτώσεων: 1. Δείγμα εντός προδιαγραφών, 2. Δείγμα εκτός προδιαγραφών, 3. Ανάγκη εκτέλεσης ενός ακόμη προσδιορισμού και 4. Πρόβλημα επαναληψιμότητας-ανάγκη διερεύνησης των αιτιών και επανάληψης του ελέγχου. Με άλλα λόγια, τα εν λόγω κριτήρια επιτελούν το σκοπό για τον οποίο προορίζονται (fitness for purpose).

Το κριτήριο Β στην περίπτωση των φαρμακευτικών προϊόντων φαίνεται σχετικά ελαστικότερο από το κριτήριο Α ως προς τις απαιτήσεις επαναληψιμότητας των αποτελεσμάτων (με υποχρέωση όμως εκκίνησης από 3 και όχι από 2 προσδιορισμούς). Η αναμενόμενη επαναληψιμότητα του ποσοτικού προσδιορισμού δραστικού συστατικού σε πρώτες ύλες (ανεξαρτήτως εφαρμοζόμενης τεχνικής) σπανίως υπερβαίνει την τιμή RSD=2%. Το αυτό ισχύει και στην περίπτωση των φαρμακευτικών προϊόντων, τόσο για την HPLC όσο και για τη Φασματοφωτομετρία UV (αποτελέσματα ελέγχων ρουτίνας του Εργαστηρίου, n=3).

Σε κάθε περίπτωση η θετική αξιολόγηση (δείγμα εντός προδιαγραφών) με βάση οποιοδήποτε κριτήριο αποτελεί ικανοποιητική εγγύηση ποιότητας του ελεγχόμενου δείγματος.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ευχαριστούμε το προσωπικό των Εργαστηρίων του ΕΟΦ, καθώς και τα εμπλεκόμενα με την αξιολόγηση των εργαστηριακών αποτελεσμάτων στελέχη του EDQM (European Directorate for the Quality of Medicines – Council of Europe) τα οποία συντονίζουν το OMCL Net.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ

1. EURACHEM/CITAC Guide CG 4, Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement, 2nd edition, 2000.
2. European Pharmacopoeia, 5th ed. (Supp 5.1, 5.2, 5.3), 2005.
3. Ελληνική Φαρμακοποιία, 5^η έκδοση (1^ο, 2^ο Συμπλήρωμα), 2002.
4. European Co-operation for Accreditation, EDQM, European OMCL Network, PA/PH/OMCL (05) 49, Uncertainty of Measurement part 1, May 2005.
5. European Co-operation for Accreditation, EA-4/16, EA Guidelines on the Expression of Uncertainty in Quantitative Testing, December 2003.
6. EMEA, 3AQ14a, Validation of Analytical Procedures: Definitions and Terminology, 1994.
7. EMEA, 3AQ13a, Validation of Analytical Procedures: Methodology, 1996.
8. Pharmeuropa, Technical Guide for the Elaboration of Monographs, 3rd edition, Chapter III, December 1999.
9. EDQM – European OMCL Net, Evaluation and Reporting of Results (Εσωτερικές Οδηγίες), 1999-2003.
10. Ebel S. Assay Content Limits in the Pharmacopoeia, Pharmeuropa, Vol. 9, No. 1, March 1997, p. 143-148.
11. UKAS, The Expression of Uncertainty and Confidence in Measurement, M3003, § 3.7, 1997.
12. EURACHEM Guide, The Fitness for Purpose of Analytical Methods, 1998.