

Onderdeel:	Kwaliteitssysteem Ziekenhuisapotheek	Documentnr.: Versie:	MVP-Paroxetine 01	
Proces:	Validatie van analytische methodes	Titel:	Methode validatie protocol voor de Bepaling van Paroxetine in serum	
Afdeling/ Werkplek:	Laboratorium	Pagina:		1 van 29

# Methode validatie protocol

## voor de

### Bepaling van Paroxetine in serum

**Documentnummer: MVP-Paroxetine**

**Versie: 01**

**Document samenstelling, review en goedkeuring:**

Rol	Naam	Functie	Datum en handtekening
1 <sup>e</sup> Auteur	J. Giesbertsen	Analist Laboratorium	
2 <sup>e</sup> Auteur	n.v.t.	n.v.t.	
Technische review	J. Wieferink	Hoofdanalist Laboratorium	
QA review en goedkeuring	B. Drese	Ziekenhuisapotheker	

Onderdeel:	Kwaliteitssysteem Ziekenhuisapothek	Documentnr.: Versie:	MVP-Paroxetine 01	
Proces:	Validatie van analytische methodes	Titel:	Methode validatie protocol voor de Bepaling van Paroxetine in serum	
Afdeling/ Werkplek:	Laboratorium	Pagina:		2 van 29

## INDEX

<b>1</b>	<b>DOEL.....</b>	<b>3</b>
<b>2</b>	<b>INTRODUCTIE .....</b>	<b>3</b>
<b>2.1</b>	<b>De te bepalen component(en) .....</b>	<b>3</b>
<b>2.2</b>	<b>De analytische methode .....</b>	<b>4</b>
<b>3</b>	<b>UITVOERING VAN DE METHODE VALIDATIE .....</b>	<b>6</b>
<b>3.1</b>	<b>Het methode validatie protocol .....</b>	<b>6</b>
<b>3.2</b>	<b>Uitvoering van het protocol.....</b>	<b>6</b>
<b>3.3</b>	<b>Deviaties en afwijkingen.....</b>	<b>7</b>
<b>3.4</b>	<b>Methode validatie rapport.....</b>	<b>7</b>
<b>4</b>	<b>VALIDATIE METHODE .....</b>	<b>8</b>
<b>4.1</b>	<b>Introductie .....</b>	<b>8</b>
<b>4.2</b>	<b>Validatie test programma .....</b>	<b>10</b>
<b>4.3</b>	<b>Samenvatting van resultaten en data Analyse.....</b>	<b>16</b>
<b>5</b>	<b>REFERENTIES.....</b>	<b>27</b>
<b>6</b>	<b>AFKORTINGEN.....</b>	<b>27</b>
<b>7</b>	<b>REVIEW EN GOEDKEURING VAN HET UITGEVOERDE PROTOCOL .....</b>	<b>28</b>
<b>8</b>	<b>LIJST MET BIJLAGEN.....</b>	<b>29</b>

Onderdeel:	Kwaliteitssysteem Ziekenhuisapothek	Documentnr.: Versie:	MVP-Paroxetine 01	
Proces:	Validatie van analytische methodes	Titel:	Methode validatie protocol voor de Bepaling van Paroxetine in serum	
Afdeling/ Werkplek:	Laboratorium	Pagina:		3 van 29

## 1 DOEL

Het doel van dit document is het beschrijven van de testen die moeten worden uitgevoerd om de methode: 'Bepaling van Paroxetine in serum' zoals deze in het laboratorium van de Gelre Ziekenhuizen, locatie Lukas te Apeldoorn is beschreven te valideren.

De validatie van de methode dient aan te tonen dat bij toepassing van deze methode reproduceerbare en juiste resultaten worden verkregen.

## 2 INTRODUCTIE

### 2.1 De te bepalen component(en)

Toepassing	PAROXETINE valt onder de psychofarmaca en is een Serotonine-heropnameremmer.
Synoniemen	.....
Producten	PAROXETINE wordt onder meer in de vorm van het geneesmiddelpreparaat Seroxat (Smith Beechem Farma) op de markt gebracht.
Metabolisme (indien relevant)	PAROXETINE wordt in het lichaam omgezet in een inactieve metaboliet. Er zijn geen andere metabolieten met een significante activiteit.
Referentiewaarden	Referentiewaarde: 10 – 75 µg/l. Het metabolisme kan geremd worden door ritonavir. Gelijktijdige behandeling met ritonavir en paroxetine is gecontraïndiceerd.
Toxische waarde	Bij overdoseringen zijn gemeld vermoeidheid, sedatie, slaperigheid, duizeligheid, braken, agitatie, rusteloosheid, tremor, ademhalingsproblemen, stupor, convulsies, cardiale symptomen en coma.
Eliminatie halfwaardetijd	PAROXETINE : ca 24 uur.
Eiwitbinding	Van PAROXETINE is ca. 95% eiwitgebonden.
Pka	PAROXETINE :

Onderdeel:	Kwaliteitssysteem Ziekenhuisapothek	Documentnr.: Versie:	MVP-Paroxetine 01	
Proces:	Validatie van analytische methodes	Titel:	Methode validatie protocol voor de Bepaling van Paroxetine in serum	
Afdeling/ Werkplek:	Laboratorium	Pagina:		4 van 29

## 2.2 De analytische methode

De te valideren methode is een HPLC bepaling die PAROXETINE kan kwantificeren. Samenvatting van het bepalingsvoorschrift:

### A) Monstervoorbereiding

1. Pipetteren van 1000 µl monster of standaard.
2. Toevoegen van 100 µl interne standaard (PROTRIPTYLINE 0.05 mg/l) en 100 µl Natriumcarbonaat 1M.
3. Extractie in 3 ml Hexaan.
4. Extractie van de organische laag met 100 µl extractievloeistof (eluens op pH 2.0), vortexen en vervolgens 100 µl water toevoegen en weer vortexen.

### B) HPLC bepaling

Parameter	Instelling
Injectie volume	20 µl
Eluens	Buffer pH 2.8 (67%) / Acetonitril (33%)
Flow	1 ml/min
Kolom	100 mm Platinum EPS C18 100 Angstrom
Temperatuur	50 °C
Detectie	Fluorescentie ex 275 nm / em 340 nm (of UV 245 nm )

### C) Kalibratie en berekeningen

De concentraties van de te kwantificeren componenten in patiëntmonsters worden berekend door kalibratie volgens de interne standaard methode.

Analyses (in enkelvoud) worden uitgevoerd op één standaard in GPO gemaakt en in triplo bepaald na extractie conform de werkwijze beschreven in sectie 2.2 punt A.

Standaard	1	2	3
PAROXETINE	60 µg/l	60 µg/l	60 µg/l

Onderdeel:	Kwaliteitssysteem Ziekenhuisapothek	Documentnr.: Versie:	MVP-Paroxetine 01	
Proces:	Validatie van analytische methodes	Titel:	Methode validatie protocol voor de Bepaling van Paroxetine in serum	
Afdeling/ Werkplek:	Laboratorium	Pagina:		5 van 29

Op basis van de resultaten wordt een kalibratie curve opgesteld die het volgende lineaire verband beschrijft tussen de concentratie van de te kwantificeren component en de piekhoogte ratio:

Concentratie van component = C1 \* (hoogte component piek / hoogte IS piek)

De model constante C1 wordt berekend op basis van lineaire regressie op grond de resultaten van de in triplo bepaalde standaard volgens de volgende formule:

$$C1 = \frac{\sum Y_i X_i}{\sum X_i^2}$$

Waarbij Y: concentratie van component en

X: piekhoogte ratio (hoogte component piek / hoogte IS piek)

#### **D) Informatie met betrekking tot het bereik van de bepaling**

Mede op basis van de informatie beschreven in sectie 2.1 (referentiewaarde en toxische waarde van de hoofdcomponent) zijn de volgende waarden voor de rapportagegrens en normaal waarde vastgesteld.

Naam	Omschrijving	Paroxetine
L	Rapportage grens	5 µg/l
N	Normaal waarde	40 µg/l

Conform procedure 5.3.11 'Valideren Klinische Analyse' is vastgesteld dat het bereik van de methode L tot 4x N moet bedragen. Het te valideren bereik voor de twee componenten is op grond daarvan:

Voor Paroxetine: 5 tot 160 µg/l

#### **E) System suitability en kwaliteitscontrole**

Maatregelen om de validiteit van de resultaten van de bepaling te bewaken in routine (zoals het uitvoeren van een system suitability test en/of het meenemen van een controle monster met gekende concentratie van de twee te onderzoeken componenten tijdens elke run) zullen na voltooiën van de validatie worden vastgesteld. Deze maatregelen zullen worden omschreven in het validatie rapport.

Onderdeel:	Kwaliteitssysteem Ziekenhuisapotheek	Documentnr.: Versie:	MVP-Paroxetine 01	
Proces:	Validatie van analytische methodes	Titel:	Methode validatie protocol voor de Bepaling van Paroxetine in serum	
Afdeling/ Werkplek:	Laboratorium	Pagina:		6 van 29

### 3 UITVOERING VAN DE METHODE VALIDATIE

#### 3.1 Het methode validatie protocol

De methode validatie zal worden uitgevoerd aan de hand van de originele en goedgekeurde versie van dit protocol. De meest relevante secties tijdens de uitvoering zijn hieronder nader omschreven:

Sectie 2 beschrijft in detail de volledig ontwikkelde methode, inclusief de kalibratie procedure.

Sectie 4 'Validatie methode' beschrijft hoe de validatie dient te worden uitgevoerd:

Sectie 4.1 beschrijft de kerngrootheden (methode validatie parameter) die tijdens de validatie dienen te worden geëvalueerd.

Sectie 4.2 beschrijft het programma van bepalingen dat moet worden uitgevoerd tijdens elk van de 3 validatie runs.

Sectie 4.3 beschrijft per kerngrootheid hoe de evaluatie van resultaten uitgevoerd moet worden, en waaraan het resultaat dient te voldoen (de acceptatie criteria). Voor elke kerngrootheid wordt na het completeren van de uitvoering van de validatie in tabelvorm een verwijzing naar de ruwe data, een verwijzing naar de data analyse, een samenvatting van de resultaten en een conclusie gedocumenteerd.

Sectie 8 bevat een lijst waarin alle bijlagen bij het uitgevoerde protocol worden gedocumenteerd.

#### 3.2 Uitvoering van het protocol

Alle relevante gegevens, inclusief batch nummers en expiratie data van alle reagentia, standaarden en andere materialen, dienen te worden gedocumenteerd in een laboratorium Logboek en moeten gemakkelijk kunnen worden teruggevonden en geraadpleegd.

Ruwe data moet worden vastgelegd in een laboratorium Logboek, voorzien van een handtekening en gedateerd. (Kopieën van) afdrukken van resultaten, kalibratie curven, en andere afdrukken van elektronische data moeten worden toegevoegd als bijlage aan dit document. Dit geldt ook voor afdrukken van de resultaten van data analyse (bijvoorbeeld pagina's van een Excel spreadsheet programma). Alle bijlagen dienen te worden opgelijst in sectie 8.

Waar nodig moeten gegevens (bijvoorbeeld verwijzingen naar bijlagen, samenvattingen van resultaten en vastleggen van conclusies) in duidelijk leesbaar handschrift in blauwe of zwarte inkt in dit protocol worden ingevuld.

Is het protocol in zijn geheel uitgevoerd, ingevuld en voorzien van bijlagen dan wordt het uitgevoerde protocol geëvalueerd op volledigheid, correctheid en overeenstemming met GMP (good manufacturing practice) richtlijnen.

Onderdeel:	Kwaliteitssysteem Ziekenhuisapothek	Documentnr.: Versie:	MVP-Paroxetine 01	
Proces:	Validatie van analytische methodes	Titel:	Methode validatie protocol voor de Bepaling van Paroxetine in serum	
Afdeling/ Werkplek:	Laboratorium	Pagina:		7 van 29

### 3.3 Deviaties en afwijkingen

Tijdens de uitvoering dit validatie protocol kunnen deviaties en afwijkingen optreden. Richtlijnen voor handelen in geval van de meest voorkomende deviaties en afwijkingen zijn weergegeven in de onderstaande tabel:

Voorbeeld van deviatie of afwijking	Handelswijze
Fouten in een protocol die geen directe impact hebben op de uitvoering van de test en de verkregen resultaten	Verbetering met pen aanbrengen. Werkwijze: 1. Te wijzigen tekst doorstrepen op een wijze dat deze nog steeds leesbaar is (in algemeen: enkelvoudige, horizontale streep); 2. Reden beschrijven (bijvoorbeeld: 'schrijffout') 3. Verbeterde tekst toevoegen 4. Paraaf toevoegen 5. Dateren.
Afwijking van methode of procedure beschreven in het protocol	Invullen van het OOS-1 formulier ten einde een formele opvolging te initiëren: zie procedure 6.6 en bijbehorende werksinstructies 6.6.1 en 6.6.2. Een verwijzing naar het formulier wordt opgenomen in het protocol en het formulier zelf wordt als bijlage toegevoegd.
Resultaten die niet in overeenstemming zijn met acceptatie criteria.	Invullen van het OOS-1 formulier ten einde een formele opvolging te initiëren: zie procedure 6.6 en bijbehorende werksinstructies 6.6.1 en 6.6.2. Een verwijzing naar het formulier wordt opgenomen in het protocol en het formulier zelf wordt als bijlage toegevoegd.

Als regel dienen alle in OOS-1 formulieren aangegeven maatregelen te zijn voltooid en het formulier te zijn afgetekend voordat een ruimte, systeem of apparaat kan worden vrijgegeven.

### 3.4 Methode validatie rapport

Na afloop van de validatie wordt een kort samenvattend rapport opgesteld. Dit rapport bevat:

- Een overzicht van de kerngrootheden (methode validatie parameters) en de eindconclusie op basis van het uitgevoerde protocol (Voldoet / Voldoet niet).
- Een overzicht van alle afwijkingen die zijn opgetreden / geconstateerd (zowel afwijkingen ten opzichte van de in het protocol voorgeschreven werkwijze als ook resultaten).

Onderdeel:	Kwaliteitssysteem Ziekenhuisapothek	Documentnr.: Versie:	MVP-Paroxetine 01	
Proces:	Validatie van analytische methodes	Titel:	Methodie validatie protocol voor de Bepaling van Paroxetine in serum	
Afdeling/ Werkplek:	Laboratorium	Pagina:		8 van 29

## 4 VALIDATIE METHODE

### 4.1 Inleiding

De methode 'Bepaling van Paroxetine in serum' zal worden uitgevoerd conform de richtlijnen in procedure 5.3.11 'Valideren Klinische Analyse'.

De volgende kerngrootheden (methode validatie parameters) worden voor de betreffende methode geëvalueerd:

Protocol sectie	Kerngrootheid
4.3.1	Specificiteit en onderzoek naar matrix effecten
4.3.2	Lineariteit & meetbereik
4.3.3	Juistheid
4.3.4	Precisie (herhaalbaarheid en reproduceerbaarheid)
4.3.5	Stabiliteit (herbepaling na 4 uur), (2 weken bij – 15 °C) en (na vries/dooi cyclus)

Ten slotte worden de berekeningen (met name met betrekking tot de kalibratie) gecontroleerd:

Protocol sectie	
4.3.6	Verificatie van de juistheid van berekeningen in HPLC software.

De volgende parameters worden niet geëvalueerd tijdens de validatie:

Parameter	Rationale
Extractie opbrengst	De absolute recovery en de herhaalbaarheid hiervan m.b.t. de extractie procedure is door het gebruik van een interne standaard niet kritisch. Het kritische aspect – een constante verhouding tussen de recovery van PAROXETINE en de recovery van de interne standaard – wordt afdoende geëvalueerd tijdens het testen van de lineariteit, juistheid en precisie van de methode.
Robuustheid	Het testen van de robuustheid is een onderdeel van de methode ontwikkeling. Aanvullende testen op de robuustheid kunnen bestaan uit de volgende onderdelen (1. kolomtemperatuur wijzigen, 2. samenstelling eluens wijzigen en 3. de pH wijzigen) en kunnen worden uitgevoerd wanneer één van de andere validatie onderdelen niet voldoet aan zijn acceptatie criteria.

De analyses voor het onderzoeken van elke kerngrootheden worden niet afzonderlijk uitgevoerd. Het is in de regel mogelijk met een beperkt aantal analyses de benodigde evaluaties te verrichten.

Onderdeel:	Kwaliteitssysteem Ziekenhuisapotheek	Documentnr.: Versie:	MVP-Paroxetine 01	
Proces:	Validatie van analytische methodes	Titel:	Methode validatie protocol voor de Bepaling van Paroxetine in serum	
Afdeling/ Werkplek:	Laboratorium	Pagina:		9 van 29

Sectie 4.2 beschrijft derhalve in detail de verschillende runs die worden uitgevoerd.

Sectie 4.3 beschrijft hoe uit de resultaten de evaluaties van de kerngrootheden en verificatie van de berekeningen in de software dienen te worden uitgevoerd.

Onderdeel:	Kwaliteitssysteem Ziekenhuisapotheek	Documentnr.: Versie:	MVP-Paroxetine 01	
Proces:	Validatie van analytische methodes	Titel:	Methode validatie protocol voor de Bepaling van Paroxetine in serum	
Afdeling/ Werkplek:	Laboratorium	Pagina:		10 van 29

## 4.2 Validatie test programma

### 4.2.1 Run 1

#### a. Doel

De resultaten van deze run zullen worden gebruikt voor de evaluatie van de matrixeffecten op de monsters in humaan serum t.o.v. standaarden in GPO en Referentie Standaarden KKGt in kalfs serum.

#### b. Test programma

De monsters (standaarden, validatie monsters, etc) worden uitgevoerd volgens de in sectie 2.2 beschreven procedure.

Het onderstaande testprogramma zal tijdens deze run worden uitgevoerd:

Monster	Vials / Replicates
Kalibratie standaard 1.5N	1 / 1
Kalibratie standaard 1.5N	2 / 1
Kalibratie standaard 1.5N	3 / 1
VM extr. 1 : Test Humaan serum (indien aanwezig b.v. Heathcontrol)	4 / 1
VM extr. 2 : Test Humaan serum (indien aanwezig b.v. Heathcontrol)	5 / 1
VM extr. 3 : N (GPO)	6 / 1
VM extr. 4 : N (GPO)	7 / 1
VM extr. 5 : Ref KKGt (Kalfs serum)	8 / 1
VM extr. 6 : Ref KKGt (Kalfs serum)	9 / 1
VM extr. 7 : gespiked (Humaan serum)	10 / 1
VM extr. 8 : gespiked (Humaan serum)	11 / 1
VM extr. 9 : Blanco (GPO) charge 1	12 / 1
VM extr. 10 : Blanco (GPO) charge 2	13 / 1
VM extr. 11 : Blanco Humaan serum	14 / 1
VM extr. 12 : Blanco Humaan serum	15 / 1

Onderdeel:	Kwaliteitssysteem Ziekenhuisapothek	Documentnr.: Versie:	MVP-Paroxetine 01	
Proces:	Validatie van analytische methodes	Titel:	Methode validatie protocol voor de Bepaling van Paroxetine in serum	
Afdeling/ Werkplek:	Laboratorium	Pagina:		11 van 29

#### 4.2.2 Run 2

##### a. Doel

De resultaten van deze run zullen worden gebruikt voor de evaluatie van de juistheid, herhaalbaarheid, lineariteit en bereik, gevoeligheid, en reproduceerbaarheid.

##### b. Test programma

De monsters (standaarden, validatie monsters, etc) worden uitgevoerd volgens de in sectie 2.2 beschreven procedure.

Het onderstaande testprogramma zal tijdens deze run worden uitgevoerd:

Monster	Vials / Replicates
Kalibratie standaard 1.5N	1 / 1
Kalibratie standaard 1.5N	2 / 1
Kalibratie standaard 1.5N	3 / 1
VM extr 1: L	4 / 1
VM extr 2: L	5 / 1
VM extr 3: 0.5N	6 / 1
VM extr 4: 0.5N	7 / 1
VM extr 5: N	8 / 1
VM extr 6: N	9 / 1
VM extr 7: 1.5N	10 / 1
VM extr 8: 1.5N	11 / 1
VM extr 9: 2N	12 / 1
VM extr 10: 2N	13 / 1
VM extr 11: 4N	14 / 1
VM extr 12: 4N	15 / 1
VM extr 13: 0.5 N	16 / 1
VM extr 14: 0.5 N	17 / 1
VM extr 15: 0.5 N	18 / 1
VM extr 16: N	19 / 1
VM extr 17: N	20 / 1
VM extr 18: N	21 / 1
VM extr 19: 2N	22 / 1
VM extr 20: 2N	23 / 1
VM extr 21: 2N	24 / 1

Onderdeel:	Kwaliteitssysteem Ziekenhuisapotheek	Documentnr.: Versie:	MVP-Paroxetine 01	
Proces:	Validatie van analytische methodes	Titel:	Methode validatie protocol voor de Bepaling van Paroxetine in serum	
Afdeling/ Werkplek:	Laboratorium	Pagina:		12 van 29

## Stabiliteit – herbepalen na 4 uur

### a. Doel

De bepaling op monsterreeks Extr. 4 tot en met 15 (L, 0.5N, N, etc) wordt nogmaals herhaald en de resultaten vergeleken met de uitkomsten van de eerste bepaling om te kijken of de concentratie van de monsters die zich bevinden in de autosampler gedurende de run constant blijven. Wij stellen de intervaltijd op 4 uur wat ruim boven de normale runtijd van een monsterreeks ligt.

Monster	Vials / Replicates
VM extr 1: L	4 / 1
VM extr 2: L	5 / 1
VM extr 3: 0.5N	6 / 1
VM extr 4: 0.5N	7 / 1
VM extr 5: N	8 / 1
VM extr 6: N	9 / 1
VM extr 7: 1.5N	10 / 1
VM extr 8: 1.5N	11 / 1
VM extr 9: 2N	12 / 1
VM extr 10: 2N	13 / 1
VM extr 11: 4N	14 / 1
VM extr 12: 4N	15 / 1

Onderdeel:	Kwaliteitssysteem Ziekenhuisapothek	Documentnr.: Versie:	MVP-Paroxetine 01	
Proces:	Validatie van analytische methodes	Titel:	Methode validatie protocol voor de Bepaling van Paroxetine in serum	
Afdeling/ Werkplek:	Laboratorium	Pagina:		13 van 29

### 4.2.3 Run 3

#### a. Doel

De resultaten van deze run worden gebruikt om de robuustheid van de bepaling vast te stellen door de juistheid, herhaalbaarheid en reproduceerbaarheid nogmaals te laten bepalen door een andere analist, op een andere dag en indien mogelijk op een ander HPLC-systeem.

#### b. Test programma

De monsters (standaarden, validatie monsters, etc) worden uitgevoerd volgens de in sectie 2.2 beschreven procedure.

Het onderstaande testprogramma zal tijdens deze run worden uitgevoerd:

Monster	Vials / Replicates
Kalibratie standaard 1.5N	1 / 1
Kalibratie standaard 1.5N	2 / 1
Kalibratie standaard 1.5N	3 / 1
VM extr 1: 0.5N	4 / 1
VM extr 2: 0.5N	5 / 1
VM extr 3: 0.5N	6 / 1
VM extr 4: 0.5N	7 / 1
VM extr 5: 0.5N	8 / 1
VM extr 6: N	9 / 1
VM extr 7: N	10 / 1
VM extr 8: N	11 / 1
VM extr 9: N	12 / 1
VM extr 10: N	13 / 1
VM extr 11: 2N	14 / 1
VM extr 12: 2 N	15 / 1
VM extr 13: 2 N	16 / 1
VM extr 14: 2 N	17 / 1
VM extr 15: 2 N	18 / 1

Onderdeel:	Kwaliteitssysteem Ziekenhuisapothek	Documentnr.: Versie:	MVP-Paroxetine 01	
Proces:	Validatie van analytische methodes	Titel:	Methode validatie protocol voor de Bepaling van Paroxetine in serum	
Afdeling/ Werkplek:	Laboratorium	Pagina:		14 van 29

#### 4.2.4 Run 4

##### a. Doel

De resultaten van deze run zullen worden gebruikt voor de evaluatie van de juistheid, herhaalbaarheid en reproduceerbaarheid. Bij voorkeur uit te voeren door een andere analist op een andere dag en indien mogelijk op een ander HPLC-systeem.

##### b. Test programma

De monsters (standaarden, validatie monsters, etc) worden uitgevoerd volgens de in sectie 2.2 beschreven procedure.

Het onderstaande testprogramma is identiek aan dat uitgevoerd tijdens run 3:

Monster	Vials / Replicates
Kalibratie standaard 1.5N	1 / 1
Kalibratie standaard 1.5N	2 / 1
Kalibratie standaard 1.5N	3 / 1
VM extr 1: 0.5N	4 / 1
VM extr 2: 0.5N	5 / 1
VM extr 3: 0.5N	6 / 1
VM extr 4: 0.5N	7 / 1
VM extr 5: 0.5N	8 / 1
VM extr 6: N	9 / 1
VM extr 7: N	10 / 1
VM extr 8: N	11 / 1
VM extr 9: N	12 / 1
VM extr 10: N	13 / 1
VM extr 11: 2N	14 / 1
VM extr 12: 2N	15 / 1
VM extr 13: 2N	16 / 1
VM extr 14: 2N	17 / 1
VM extr 15: 2N	18 / 1

Onderdeel:	Kwaliteitssysteem Ziekenhuisapotheek	Documentnr.: Versie:	MVP-Paroxetine 01	
Proces:	Validatie van analytische methodes	Titel:	Methode validatie protocol voor de Bepaling van Paroxetine in serum	
Afdeling/ Werkplek:	Laboratorium	Pagina:		15 van 29

#### 4.2.5 Run 5

##### a. Doel

De resultaten van run 4 als wel een aantal resultaten uit run 3 zullen worden gebruikt voor de evaluatie van de stabiliteit van zowel de monsters en standaarden na extractie als wel na herhaalde vries/dooi cycli. De uitkomsten van 0.5 N en 2N uit Run 3 en 4 kunnen beschouwd worden als t=0 voor de vries/dooi cycli.

##### b. Test programma

Monster voorbereiding en test programma voor run 5 zijn wat monstervoorbereiding identiek aan die voor run 2 ten aanzien van de te testen monsters wordt een ander monster schema gehanteerd.

Monster	Vials / Replicates
Kalibratie standaard 1.5N	1 / 1
Kalibratie standaard 1.5N	2 / 1
Kalibratie standaard 1.5N	3 / 1
VM extr 1: 0.5N (2 weken bij – 15 °C)	4 / 1
VM extr 2: 0.5N (2 weken bij – 15 °C)	5 / 1
VM extr 3: 0.5N (2 weken bij – 15 °C)	6 / 1
VM extr 4: 2N (2 weken bij – 15 °C)	7 / 1
VM extr 5: 2N (2 weken bij – 15 °C)	8 / 1
VM extr 6: 2N (2 weken bij – 15 °C)	9 / 1
VM extr 7: 0.5N (na vries/dooi cyclus)	10 / 1
VM extr 8: 0.5N (na vries/dooi cyclus)	11 / 1
VM extr 9: 0.5N (na vries/dooi cyclus)	12 / 1
VM extr 10: 2N (na vries/dooi cyclus)	13 / 1
VM extr 11: 2N (na vries/dooi cyclus)	14 / 1
VM extr 12: 2N (na vries/dooi cyclus)	15 / 1

Onderdeel:	Kwaliteitssysteem Ziekenhuisapotheek	Documentnr.: Versie:	MVP-Paroxetine 01	
Proces:	Validatie van analytische methodes	Titel:	Methode validatie protocol voor de Bepaling van Paroxetine in serum	
Afdeling/ Werkplek:	Laboratorium	Pagina:		16 van 29

## 4.3 Samenvatting van resultaten en data Analyse

### 4.3.1 Selectiviteit en onderzoek naar matrix effecten

#### a. Rationale

De selectiviteit is het vermogen van de methode om de te bepalen component te onderscheiden van andere bestanddelen van de matrix (humaan serum). In dit test script worden 2 blanco matrix monsters van onafhankelijke herkomst (2 charges bij GPO en/of 2 verschillende "blanco" patiënten monsters bij humaan serum) beoordeeld op componenten die de bepaling van PAROXETINE en/of PROTRIPTYLINE (interne standaard) tijdens de chromatografische bepaling kunnen verstoren.

n.b. Blanco patiënten monsters zijn aanvragen op een andere farmaceutische component !

Bij patiëntmonsters handelt het zich om in monsters in humaan serum. Om praktische redenen is het de bedoeling om zowel de kalibratie standaarden als ook de validatie testmonsters in een alternatieve matrix (Gepasteuriseerde plasma-eiwit oplossing (GPO) of dierlijk serum te bereiden (KKGK kalfsserum)).

#### b. Methode

De bepaling wordt uitgevoerd op twee onafhankelijke serum monsters van zowel GPO, "blanco" Humaan serum als wel KKGK Kalfsserum.

#### c. Acceptatie Criteria

Interferentie van matrixcomponenten: in geen van de chromatogrammen van GPO , "blanco" Humaan serum en KKGK Kalfsserum bevinden zich pieken bij retentietijden die overeenkomen met die van PAROXETINE en/of PROTRIPTYLINE (interne standaard).

Vergelijk effect matrix (GPO en KKGK Kalfsserum vs Humaan serum) op recovery.

De gemiddelde terugvinding van de matrices moet 85-115% bedragen.

Onderdeel:	Kwaliteitssysteem Ziekenhuisapotheek	Documentnr.: Versie:	MVP-Paroxetine 01	
Proces:	Validatie van analytische methodes	Titel:	Methode validatie protocol voor de Bepaling van Paroxetine in serum	
Afdeling/ Werkplek:	Laboratorium	Pagina:		17 van 29

#### **d. Resultaten en conclusie**

Bijlage(n) m.b.t. ruwe data	
Bijlagen m.b.t. data analyse	
Samenvatting van resultaten	
Conclusie	Voldoet / Voldoet niet
Data geanalyseerd door	
Datum	

Onderdeel:	Kwaliteitssysteem Ziekenhuisapotheek	Documentnr.: Versie:	MVP-Paroxetine 01	
Proces:	Validatie van analytische methodes	Titel:	Methode validatie protocol voor de Bepaling van Paroxetine in serum	
Afdeling/ Werkplek:	Laboratorium	Pagina:		18 van 29

#### 4.3.2 Lineariteit en meetbereik

##### a. Rationale

De lineariteit van een analytische procedure geeft aan in hoeverre (binnen een gegeven bereik) test resultaten worden verkregen met een respons die recht evenredig is met de concentratie (hoeveelheid) van de te bepalen component in het monster. Het meetbereik van de bepaling wordt bepaald door het bereik dat tijdens de validatie is geëvalueerd.

##### b. Methode

Na kalibratie worden tijdens run 2 de monsters met de volgende nominale concentraties PAROXETINE in duplo geanalyseerd (monster 4 t/m 15) :

Naam	Omschrijving	PAROXETINE
L	Rapportage grens	5 µg/l
0.5 N	0.5x normaalwaarde	20 µg/l
N	Normaal waarde	40 µg/l
1.5 N	1.5x normaalwaarde	60 µg/l
2 N	2x normaalwaarde	80 µg/l
4 N	Bovengrens	160 µg/l

Voor elke waarneming wordt de bepaalde waarde vergeleken met de nominale waarde.

Bereken de signaal ruis verhouding voor de PAROXETINE resulterend van analyse van het 'L' monster:

$$S / N \text{ ratio} = \text{hoogte van de component piek} / \text{amplitude van basislijn}$$

##### c. Acceptatie criteria

Tenminste 8 van de 12 waarnemingen, inclusief de resultaten van de bepalingen op de beide 'L' en '4N' monsters, voldoen aan de volgende criteria:

- Deviatie  $\leq$  20% van de nominale waarde voor het 'L' monster
- Deviatie  $\leq$  15% van de nominale waarde voor overige monsters

De signaal / ruis verhouding voor de pieken van PAROXETINE in de 'L' monsters bedraagt tenminste 10.

Onderdeel:	Kwaliteitssysteem Ziekenhuisapotheek	Documentnr.: Versie:	MVP-Paroxetine 01	
Proces:	Validatie van analytische methodes	Titel:	Methode validatie protocol voor de Bepaling van Paroxetine in serum	
Afdeling/ Werkplek:	Laboratorium	Pagina:		19 van 29

#### **d. Resultaten en conclusie**

Bijlage(n) m.b.t. ruwe data	
Bijlagen m.b.t. data analyse	
Samenvatting van resultaten	
Conclusie	Voldoet / Voldoet niet
Data geanalyseerd door	
Datum	

Onderdeel:	Kwaliteitssysteem Ziekenhuisapothek	Documentnr.: Versie:	MVP-Paroxetine 01	
Proces:	Validatie van analytische methodes	Titel:	Methode validatie protocol voor de Bepaling van Paroxetine in serum	
Afdeling/ Werkplek:	Laboratorium	Pagina:		20 van 29

### 4.3.3 Juistheid

#### a. Rationale

De juistheid van een bepaling geeft aan in hoeverre het verkregen resultaat overeenkomt met de werkelijke waarde of de als werkelijk aangenomen waarde. De juistheid wordt bepaald over de range van de bepaling.

#### b. Methode

Op elk niveau wordt telkens 5x een bepaling uitgevoerd op 3 concentratie niveaus:

Naam	Omschrijving	PAROXETINE
0.5 N	0.5x normaalwaarde	20 µg/l
N	Normaal waarde	40 µg/l
2 N	2x normaalwaarde	80 µg/l

Voor elke bepaling wordt de terugvinding berekend (waarde volgens de bepaling / theoretische waarde \* 100%).

#### c. Acceptatie Criteria

De gemiddelde terugvinding op elk niveau moet 85-115% bedragen.

#### d. Resultaten en conclusie

Bijlage(n) m.b.t. ruwe data	
Bijlagen m.b.t. data analyse	
Samenvatting van resultaten	
Conclusie	Voldoet / Voldoet niet
Data geanalyseerd door	
Datum	

Onderdeel:	Kwaliteitssysteem Ziekenhuisapotheek	Documentnr.: Versie:	MVP-Paroxetine 01	
Proces:	Validatie van analytische methodes	Titel:	Methode validatie protocol voor de Bepaling van Paroxetine in serum	
Afdeling/ Werkplek:	Laboratorium	Pagina:		21 van 29

#### 4.3.4 Precisie

##### a. Rationale

De precisie van een analytische methode is de mate van spreiding in de analyse resultaten die verkregen worden door de analysemethode een herhaald aantal malen op hetzelfde monster uit te voeren. Tijdens de validatie wordt de precisie op twee wijzen bepaald: als herhaalbaarheid (precisie van herhaalde analyses binnen dezelfde analyserun) en reproduceerbaarheid (precisie van resultaten van 3 runs uitgevoerd op 3 verschillende dagen). Omdat de reproduceerbaarheid in hetzelfde laboratorium wordt bepaald, kan worden gesproken van 'intra-reproduceerbaarheid' (Engels: intermediate precision).

Precisie is berekend als de relatieve standaard deviatie (RSD) van resultaten van een serie bepalingen.

##### b. Methode

Gedurende 3 runs (run 2, 3 en 4) wordt de terugvinding telkens 5x bepaald op 3 monsters met gekende concentraties van de te kwantificeren componenten op niveau 0.5 N, N en 2N. Voor elk resultaat wordt de terugvinding (waarde volgens de bepaling / theoretische waarde \* 100%) berekend.

Naam	Omschrijving	PAROXETINE
0.5 N	0.5x normaalwaarde	20 µg/l
N	Normaal waarde	40 µg/l
2 N	2x normaalwaarde	80 µg/l

De herhaalbaarheid wordt op elk niveau bepaald door de RSD van de terugvinding waarden (n=5) te berekenen. Per niveau worden 3 resultaten voor de herhaalbaarheid verkregen (voor elke run 1).

De intermediate precision wordt op elk niveau bepaald door de RSD van de 15 waarden van de 3 opeenvolgende runs te berekenen.

##### c. Acceptatie Criteria

Zowel voor herhaalbaarheid als intra-reproduceerbaarheid: RSD maximaal 15%.

Onderdeel:	Kwaliteitssysteem Ziekenhuisapotheek	Documentnr.: Versie:	MVP-Paroxetine 01	
Proces:	Validatie van analytische methodes	Titel:	Methode validatie protocol voor de Bepaling van Paroxetine in serum	
Afdeling/ Werkplek:	Laboratorium	Pagina:		22 van 29

#### **d. Resultaten en conclusie**

Bijlage(n) m.b.t. ruwe data	
Bijlagen m.b.t. data analyse	
Samenvatting van resultaten	
Conclusie	Voldoet / Voldoet niet
Data geanalyseerd door	
Datum	

Onderdeel:	Kwaliteitssysteem Ziekenhuisapothek	Documentnr.: Versie:	MVP-Paroxetine 01	
Proces:	Validatie van analytische methodes	Titel:	Methode validatie protocol voor de Bepaling van Paroxetine in serum	
Afdeling/ Werkplek:	Laboratorium	Pagina:		23 van 29

### 4.3.5 Stabiliteit

#### a. Rationale

Verschillende vormen van stabiliteit kunnen een invloed op de juistheid van het resultaat van de bepaling:

1. stabiliteit van het monster na afname en tijdens bewaren voorafgaande aan extractie run1 en 5.
2. stabiliteit na herhaalde vries / dooi cycli run 1 en 5.
3. stabiliteit van de HPLC monsters na extractie en voorafgaande aan analyse run 2.

Opm. Stabiliteit van de standaarden en de houdbaarheidsduur wordt gewaarborgd of vastgesteld volgens de in het Kwaliteitsboek beschreven procedures: 4.4.31 Beheer Kwantificatie- en Controlemateriaal.

Tevens kan er verwezen worden naar een landelijke database : Databank Houdbaarheid referentiestoffen. (<http://nvkfaz.ziekenhuis.nl/index.htm>)

De stabiliteit van de Interne Standaarden worden gewaarborgd door het instellen van System Suitability Testen (SST) als onderdeel van de bepalingen.

In deze SST wordt de hoogte van de Interne Standaard piek gecheckt om eventuele ontleding vroegtijdig te constateren.

#### b. Methode

Aspect	Beschrijving	Methode
1	Stabiliteit van het monster na afname en tijdens bewaren voorafgaande aan extractie	Zes buizen, drie buizen met een lage concentratie en 3 met een hoge concentratie worden bereid. De concentraties van de beide componenten worden na bereiding en na twee weken bewaren onder de voorgeschreven omstandigheden. (vriezer, $\leq -15^{\circ}\text{C}$ ) bepaald.
2	Stabiliteit na herhaalde vries / dooi cycli	Zes buizen, drie buizen met een lage concentratie en 3 met een hoge concentratie worden bereid. De concentraties van de beide componenten worden na bereiding en na het uitvoeren van 3 opeenvolgende vries / dooi cycli bepaald (telkens 24 h in vriezer, $\leq -15^{\circ}\text{C}$ en vervolgens ontdooien in stoof bij $37^{\circ}\text{C}$ ) bepaald.
3	Stabiliteit van de HPLC monsters na extractie en voorafgaande aan analyse	12 geëxtraheerde monsters (range L tot 4 N) zullen tijdens run 2 vrij snel na aanmaak worden bepaald en na 4 uur incubatie in de autosampler tray.

Onderdeel:	Kwaliteitssysteem Ziekenhuisapotheek	Documentnr.: Versie:	MVP-Paroxetine 01	
Proces:	Validatie van analytische methodes	Titel:	Methode validatie protocol voor de Bepaling van Paroxetine in serum	
Afdeling/ Werkplek:	Laboratorium	Pagina:		24 van 29

Vul in onderstaande tabel de data van het ontdooien (ongeveer 0.5 uur bij 37 °C in stoof).

Hierna het monster mengen en vervolgens minimaal gedurende 24 uur bewaren in de vriezer.

Datum	Monster ontdooid (OK/NOK)	Paraaf

### c. Acceptatie Criteria

Het verschil tussen het resultaat voor en na bewaren of uitvoeren van herbepaling na 4 uur van Run 2 en de vries/dooi cycli bedraagt niet meer dan 10%.

### d. Resultaten en conclusie

Bijlage(n) m.b.t. ruwe data	
Bijlagen m.b.t. data analyse	
Samenvatting van resultaten	
Conclusie	Voldoet / Voldoet niet
Data geanalyseerd door	
Datum	

Onderdeel:	Kwaliteitssysteem Ziekenhuisapothek	Documentnr.: Versie:	MVP-Paroxetine 01	
Proces:	Validatie van analytische methodes	Titel:	Methode validatie protocol voor de Bepaling van Paroxetine in serum	
Afdeling/ Werkplek:	Laboratorium	Pagina:		25 van 29

#### 4.3.6 Evaluatie van berekeningen

##### a. Rationale

Het is van belang dat de berekeningen in routine worden uitgevoerd om de concentratie van PAROXETINE in patiëntmonsters vast te stellen juist zijn. Voor de te valideren bepaling worden deze berekeningen uitgevoerd in de Chromquest software (Thermo Electron corporation).

Een aantal kritische berekeningen worden in dit testscript gecontroleerd. Afwijkingen tussen de door de Chromquest software berekende resultaten en de onafhankelijk berekende resultaten conform de in sectie 2.2 gedocumenteerde formules (in de regel uitgevoerd in Excel) kunnen duiden op:

- foutieve of afwijkende berekeningen in de software.
- verkeerd opstellen van de methode.
- issues met betrekking tot afronden (in bepaalde gevallen leidend tot geringe en daarom vaak niet-kritische verschillen).

##### b. Methode

Berekenen in Excel voor elke kalibratielijns voor elk punt:

X waarde: piekhoogte ratio (hoogte component piek / hoogte IS piek)

Y waarde: nominale concentratie in standaard (mg/l)

Bereken in Excel middels lineaire regressie de regressie constante C1 voor het volgende lineaire verband:

Concentratie van component = C1 \* (hoogte component piek / hoogte IS piek)

Volg hierbij de volgende procedure:

- Selecteer de optie 'Extra' => 'Gegevensanalyse' => 'Regressie' (NB: als de optie 'Gegevensanalyse' niet beschikbaar is, maak deze beschikbaar door het kiezen van de optie 'Extra' => 'Invoegtoepassingen' en het aanklikken van de optie 'Analysis Toolpack').
- Invoerbereik Y: selecteer de cellen met de 3 waarden voor de concentratie van de component (PAROXETINE) in de standaard (µg/l).
- Invoerbereik X: selecteer de cellen met de 3 waarden voor de bijbehorende piekhoogte ratio's.
- Selecteer de optie 'door de oorsprong'.

Onderdeel:	Kwaliteitssysteem Ziekenhuisapothek	Documentnr.: Versie:	MVP-Paroxetine 01	
Proces:	Validatie van analytische methodes	Titel:	Methode validatie protocol voor de Bepaling van Paroxetine in serum	
Afdeling/ Werkplek:	Laboratorium	Pagina:		26 van 29

- Selecteer de optie 'Uitvoerbereik'; klik op het naastliggende invoerveld. Selecteer vervolgens een cel op het werkblad onder de ingevoerde gegevens. Dit is de linkerbovenhoek van een blok van 9 cellen breed en 21 cellen hoog waarin de regressie resultaten zullen worden weergegeven; zorg ervoor dat dit blok beschikbaar is zonder dat andere gegevens op het werkvlak worden overschreven.
- Druk op 'OK'. In de resultaten tabel moet de waarde voor 'Snijpunt' 0 bedragen; de waarde voor 'Variabele X 1' komt overeen met de waarde van de regressieconstante C1 voor de kalibratiecurve van de betreffende component.

Bereken voor 3 validatie monsters met verschillende concentratie niveaus de concentratie op basis van de piekhoogte ratio:

$$\text{Concentratie PAROXETINE} = C1_{\text{PAROXETINE}} * (\text{hoogte PAROXETINE piek} / \text{hoogte IS piek})$$

Vergelijk de aldus berekende resultaten met de resultaten op de print-out van de resultaten van de 3 bepalingen afkomstig van de Chromquest software.

### c. Acceptatie Criteria

De 3 resultaten berekend door de Chromquest software en de onafhankelijk berekende resultaten in Excel wijken niet meer af dan 0.1 mg/l.

### d. Resultaten en conclusie

Bijlage(n) m.b.t. ruwe data	
Bijlagen m.b.t. data analyse	
Samenvatting van resultaten	
Conclusie	Voldoet / Voldoet niet
Data geanalyseerd door	
Datum	

Onderdeel:	Kwaliteitssysteem Ziekenhuisapotheek	Documentnr.: Versie:	MVP-Paroxetine 01	
Proces:	Validatie van analytische methodes	Titel:	Methode validatie protocol voor de Bepaling van Paroxetine in serum	
Afdeling/ Werkplek:	Laboratorium	Pagina:		27 van 29

## 5 REFERENTIES

- FDA Guidance for Industry: 'Bioanalytical Method Validation'
- ICH Guidance Q2A 'Text on the Validation of Analytical Procedures'
- ICH Guidance Q2B 'Validation of Analytical Procedures: Methodology'

## 6 AFKORTINGEN

GPO	Gepasteuriseerd Plasma-eiwit Oplossing
ICH	International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use
KKGT	Stichting Kwaliteitsbewaking Klinische Geneesmiddelanalyse en Toxicologie
QA	Quality Assurance
Ref.	Referentie
RSD	Relatieve Standaard Deviatie
SD	Standaard Deviatie

Onderdeel:	Kwaliteitssysteem Ziekenhuisapotheek	Documentnr.: Versie:	MVP-Paroxetine 01	
Proces:	Validatie van analytische methodes	Titel:	Methode validatie protocol voor de Bepaling van Paroxetine in serum	
Afdeling/ Werkplek:	Laboratorium	Pagina:		28 van 29

## 7 REVIEW EN GOEDKEURING VAN HET UITGEVOERDE PROTOCOL

Het uitgevoerde protocol ten behoeve van de validatie van de analytische methode 'Bepaling van Paroxetine in serum' is geëvalueerd. De reviewer geeft door het aftekenen van het protocol in onderstaande tabel te kennen dat in zijn / haar mening de testen volledig zijn uitgevoerd en de resultaten correct en in overeenstemming met GMP (good manufacturing practice) richtlijnen zijn gedocumenteerd:

APOTHEEK GELRE ZIEKENHUIZEN			
Naam	Functie	Handtekening	Datum

