

Walidacja metody oznaczania 8- α -hydroksymutyliny w materiale biologicznym

RAFAŁ ZAŃ, CEZARY KOWALSKI, ARTUR BURMAŃCZUK

Zakład Farmakologii Katedry Przedklinicznych Nauk Weterynaryjnych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej AR,
ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin

Zań R., Kowalski C., Burmańczuk A.

Validation method for determination of 8- α -hydroxymutilin in biological material

Summary

A validation method is a key element in both the elaboration of reference methods and the assessment of a laboratory's competence in producing reliable analytical data. The aim of the study was to validate the GC method (according to Marcus and Sherma), which is used in determining 8- α -hydroxymutilin in a biological matrix (swine tissues: liver and muscles). The fundamental parameters for validation, including accuracy, precision, selectivity, sensitivity, reproductibility and stability, were estimated. The studies confirmed the usefulness of the GC method for determining tiamulin residues in swine tissues.

Keywords: 8- α -hydroxymutilin, tiamulin, pigs

Według zaleceń Europejskiej Agencji Oceny Produktów Medycznych (EMA), metody analityczne służące do określania pozostałości leków weterynaryjnych muszą być zwalidowane, tzn. spełniać szereg wymogów potwierdzających ich przydatność (2). Parametrami charakteryzującymi przydatność metody są: potwierdzenie identyczności, selektywności i specyficzności, granica wykrywalności, granica oznaczenia ilościowego, zakres roboczy i zakres liniowości, dokładność, precyzja, czułość, powtarzalność i odtwarzalność, niepewność pomiaru, odporność metody na zmiany warunków oraz odzysk. Ponadto procedury analityczne nie powinny być kosztowne. Wobec tak rygorystycznych wymogów, wszelkie uprzednio wykonane badania z zastosowaniem niezwalidowanych metod straciły na swym znaczeniu (1, 3, 4-6, 10, 13).

Szczegółowe założenia dotyczące walidacji metod analitycznych stosowanych w badaniach farmakokinetycznych i dostępności biologicznej obejmują (2, 8, 11, 14):

- trwałość analitu w matrycy biologicznej, tj. zawartość analitu w próbkach biologicznych w trakcie procedury analitycznej w temperaturze pokojowej oraz podczas przechowywania próbek (w temp. np. 4°C, -20°C lub -80°C) nie powinna zmieniać się więcej niż o $\pm 5\%$ lub o $\pm 15\%$ w przypadku derywatywacji oraz określenie wpływu na powyższą zawartość analitu co najmniej dwóch cykli zamrażania (np. do -20°C i/lub do -80°C) i rozmrażania próbek biologicznych,
- selektywność metody, która odnosi się do metabolitów analitu, ewentualnie jego produktów rozkładu i związków egzogennych, np. innych leków, stosowanych u danego pacjenta.

Wymaga to sprawdzenia metody nie tylko na próbkach materiału biologicznego, nastrzykiwanego danym analitem, lecz także w odniesieniu do próbek pobranych od chorego lub doświadczalnego zwierzęcia otrzymującego dany lek,

- kierunek: metoda analityczna powinna dotyczyć leku i/lub jego metabolitu, które decydują o działaniu farmakologicznym,

- sposób wykonania krzywej: krzywą wzorcową należy obliczyć metodami statystycznymi, na podstawie 5-8 punktów doświadczalnych, stanowiących średnią z 2-3 próbek,

- ustalenie zakresu stężeń krzywej wzorcowej. W tym celu należy wyznaczyć dolną granicę wykrywalności (LOD) i dolną granicę oznaczalności (LOQ). LOD jest to najmniejsze stężenie, którego pik można odróżnić od szumów. LOQ powinna co najmniej 2 razy przewyższać LOD,

- dokładność, która określa odchylenie (w %) oznaczonej wartości od wartości prawdziwej. Odzysk dodanego analitu do matrycy w zakresie oznaczanych stężeń jest przeważnie miarą dokładności. Odzysk akceptowany przez różnych autorów wynosi 50%, 80% lub 90%.

- precyzję, która jest miarą powtarzalności wyników oznaczeń wielokrotnych tej samej próbki. Zwykle odnosi się ją do oznaczeń w danym dniu i do oznaczeń w kolejnych dniach. Powinny być wyznaczone dla co najmniej 3 różnych stężeń z zakresu krzywej wzorcowej: zbliżonych do LOQ, w pobliżu stężenia środkowego i tuż poniżej stężenia maksymalnego. Średnie wartości precyzji i dokładności powinny się

mieścić w zakresie $\pm 15\%$ wartości prawdziwej. Jedyne dla LOQ jest akceptowalna wartość nie przewyższająca 20%.

Celem badań była walidacja metody oznaczania tiamuliny w tkankach wskaźnikowych świń.

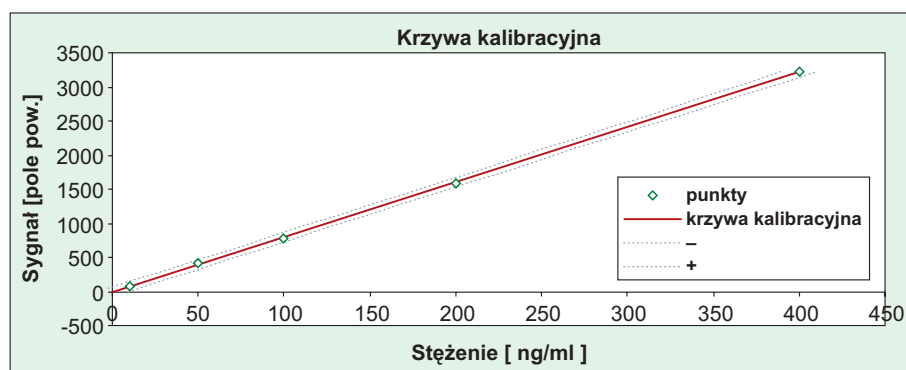
Materiał i metody

Procedura. Walidacji poddano metodę GC wg Marcus i Sherma (9), za pomocą której można określić poziom markera pozostałości tiamuliny w tkankach zwierzęcych. Walidowana metoda składa się z wielu etapów, prowadzących do otrzymania finalnej próby z analitem przystosowanym do oznaczeń za pomocą chromatografu GC wyposażonego w detektor wychwyty elektronów. W tym celu każdą próbę na odzysk oraz próby ślepe poddawano identycznej procedurze jak próby pozyskane od zwierząt doświadczalnych, tzn. homogenizacji tkanek, dwukrotnej ekstrakcji tiamuliny z tkanek, eliminacji tłuszczu (w temp. -80°C), etapowi hydrolizy metabolitów tiamuliny, etapowi sprzęgania metabolitów w celu formowania fluorowej pochodnej 8- α -hydroksymutyliny oraz etapowi oczyszczania derywatu (9).

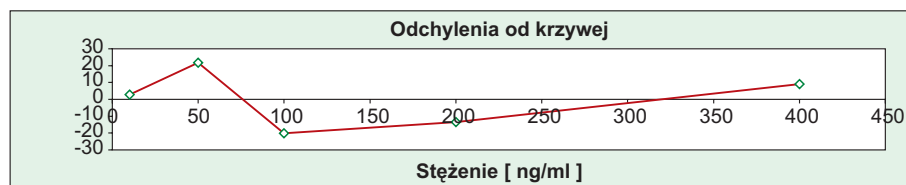
Trwałość analitu w matrycy biologicznej. Badania trwałości analitu przeprowadzono na próbkach wątroby i mięśni, poddanych całemu cyklowi analitycznemu według Marcus i Sherma (9), rozpuszczonych w benzenie. Próbkę przechowywano w szczelnie zamkniętych kolbach w temp. 4°C , -20°C i -80°C . Poziom analitu oceniano codziennie przez okres 1 tygodnia, za pomocą chromatografu gazowego Unicam, wyposażonego w detektor wychwyty elektronów (ECD).

Zakres liniowy metody. Krzywą kalibracyjną dla chromatograficznego oznaczania fluorowcopolodnej 8-hydroksymutyliny, z wykorzystaniem detektora wychwyty elektronów (ECD), wykreślono na podstawie pięciu punktów kalibracyjnych (tab. 1).

Do punktów kalibracyjnych, metodą najmniejszych kwadratów, dopasowano krzywą kalibracyjną (ryc. 1) w posta-



Ryc. 1. Równanie krzywej oraz krzywa kalibracyjna dla 8- α -hydroksymutyliny. Równanie krzywej: $y = 8,0637971 x + (-9,319155)$



Ryc. 2. Odchylenia od krzywej kalibracyjnej

ci $y = ax + b$, gdzie y oznacza pole powierzchni pików, x oznacza stężenie analitu.

Procedura sprawdzenia dokładności metody GC na podstawie określenia stopnia odzysku 8- α -hydroksymutyliny z tkanek kontrolnych.

Do próbek tkanek kontrolnych (wątroba, mięśnie) o masie 30,0 g dodawano po 2 μg , 4 μg i 6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ wzorca 8- α -hydroksymutyliny i poddawano analogicznej procedurze wg Marcus i Sherma (9).

Potwierdzenie specyficzności metody oznaczania 8- α -hydroksymutyliny przy użyciu GC/MS wg Marcus i Sherma (10). Po analizie na chromatografii gazowej (GC) prób na odzysk, dokonano walidacji próbki wątroby badanej przy użyciu GC/MS.

Określenie granicy wykrywalności (LOD) i oznaczalności (LOQ). Z krzywej kalibracyjnej wyznaczono również granicę wykrywalności LOD (limit of detection) (dane tab. 2) według wzoru:

$$\text{LOD} = \frac{3 \cdot s_{yx}}{\alpha}$$

i granicę oznaczalności LOQ (limit of quantification) według wzoru:

$$\text{LOQ} = \frac{3 \cdot s_{yx}}{\alpha}$$

Wyniki i omówienie

W trakcie badań nie stwierdzono znacznych odchyleń ($\geq 15\%$) zawartości analitu w próbkach, co jest zgodne z założeniami walidacji metod analitycznych dotyczących derywatów.

Na podstawie procedury przeprowadzonej dla standardu wewnętrznego do wykreślenia krzywej wzorcowej, ustalono średnią wartość odzysku \pm SD, która wynosiła średnio dla wątroby 86,82% i dla mięśni 74,43%. W trakcie badań nad stopniem odzysku nie stwierdzono znaczącego nakładania się pików w próbach, co potwierdza dostateczną procedurę oczyszczania próbek. Ponadto, pik fluorowcowej pochodnej 8- α -hydroksymutyliny (XP) był głównym pikiem stwierdzanym na chromatogramach, co świadczy o specyficzności i czułości procedury użytej do oznaczania markera pozostałości tiamuliny.

Badaniem GC/MS potwierdzono występowanie XP w próbce wątroby

Tab. 1. Punkty kalibracyjne służące do wykreślenia krzywej kalibracyjnej

Nr	x Stężenie analitu [ng/ml]	y Pole powierzchni piku
1	10	74,22
2	50	415,57
3	100	776,98
4	200	1589,93
5	400	3225,19

Tab. 2. Parametry wyznaczone za pomocą regresji liniowej

Współczynnik kierunkowy (nachylenie) α	8,0637971
Wyraz wolny b	-9,319155
Współczynnik korelacji r_{xy}	0,9999093
Odchylenie standardowe współ. kier. s_a	0,0627249
Odchylenie standardowe wyrazu wolnego s_b	12,93411
Odchylenie standardowe metody s_{yx} (błąd pojedynczego pomiaru)	19,54361 (pole pow.)

Tab. 3. Sprawdzenie dokładności metody chromatograficznej /GC/ na podstawie procentu odzysku markera tiamuliny – 8- α -hydroksymutyliny z tkanek kontrolnych świń

Nr próbki	Data oznaczenia	Stężenie w tkance (ng)	Średnia \bar{x}	\pm SD	RSD %	Odzysk %	Odzysk \bar{x}	Odzysk \pm SD
M ₁	09.04.03	103,876	103,794	2,862075	2,75745	74,4957	74,43	2,052
M ₂	11.04.03	105,072				75,3536		
M ₃	13.04.03	98,842				70,8854		
M ₄	16.04.03	105,314				75,5272		
M ₅	18.04.03	105,866				75,9229		
W ₁	20.04.03	120,445	121,074	3,312366	2,73581	86,3784	86,82	2,375
W ₂	22.04.03	117,960				84,5963		
W ₃	24.04.03	117,940				84,5784		
W ₄	27.04.03	124,165				89,0466		
W ₅	29.04.03	124,867				89,5496		

Objaśnienia: M – próbka mięśni, W – próbka wątroby

badanej na odzysk z dodanym standardem 8- α -hydroksymutyliny, którego nie stwierdzano w próbkach tkanek kontrolnych. Badaniem spektrometrycznym wykazano dla 8- α -hydroksymutyliny sprzężonej z bez-

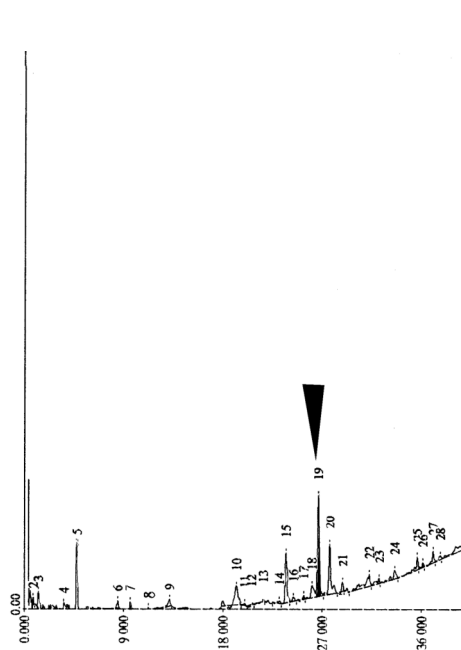
wodnym pentafluoropropionianem, następujące charakterystyczne piki jonów cząsteczkowych: 285, 325 i 447 (ryc. 6) dla tego standardu zgodnych z danymi w pracy Marcus i Sherma (10). Wyznaczone granice wykrywalności i oznaczalności wyniosły odpowiednio: LOD = 7,270872 ng/ml oraz LOQ = 23,99388 ng/ml.

Nowoczesne metody chromatograficzne, dzięki zastosowaniu odpowiednich kolumn chromatograficznych i czułych aparatów detekcyjnych, pozwalają na precyzyjne określanie nawet śladowych zawartości

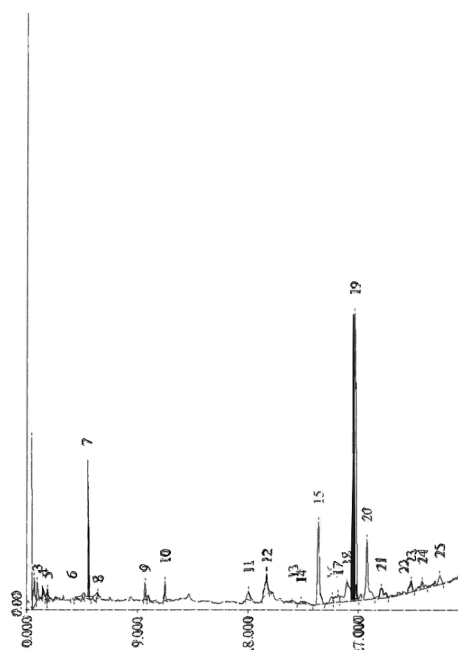
substancji w badanych próbkach materiału biologicznego. Metoda oznaczeń tiamuliny wg Marcus i Scherma (9) w modyfikacji własnej, dzięki zastosowaniu metody chromatografii gazowej charakteryzującej się stosunkowo wysokim stopniem rozdzielczości oraz detektorowi wychwytu elektronów, który posiada zdolność detekcji 2×10^{-14} g/s (12) jest odpowiednim narzędziem służącym do oznaczenia poziomu markera pozostałości tej substancji w tkankach zwierzęcych. Pozwala ona na wykrycie tej substancji już przy stężeniach powyżej 30 ng/g, co jest istotne zwłaszcza przy badaniu tkanek wskaźnikowych pochodzących

od zwierząt leczonych tiamuliną.

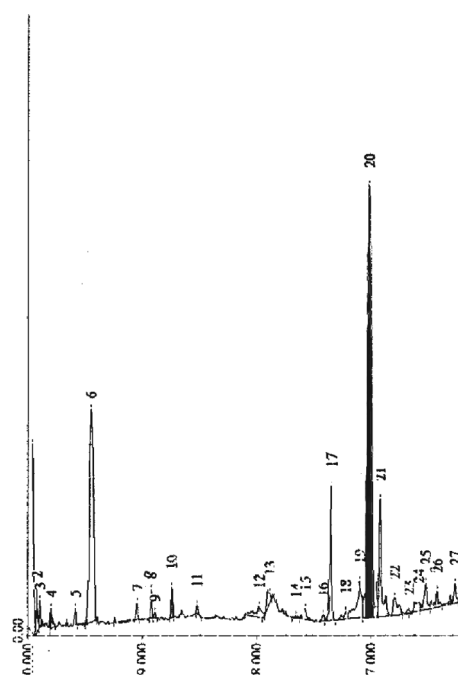
Także metody walidacyjne, m.in. badanie z zastosowaniem spektrometru masowego, potwierdzają trafność w wyborze techniki chromatograficznej oraz po-



Ryc. 3. Chromatogram – standard zewnętrzny 100 ng

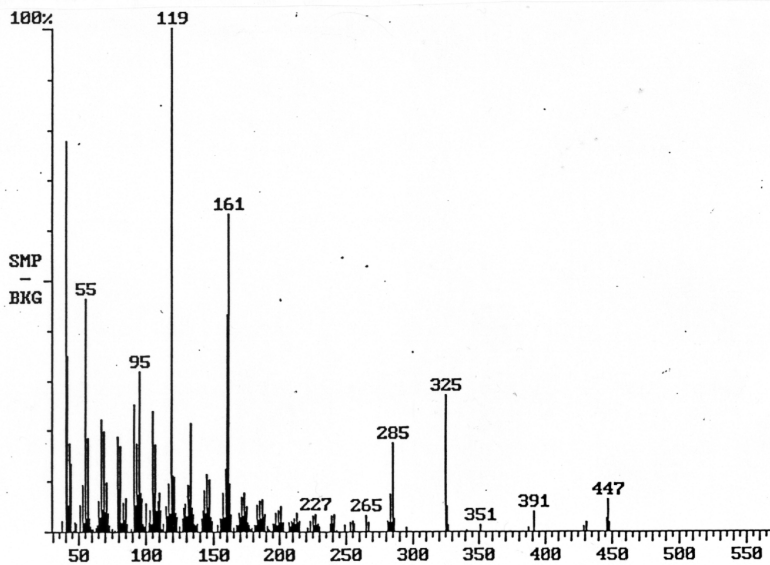


Ryc. 4. Chromatogram – standard zewnętrzny 200 ng



Ryc. 5. Chromatogram – standard zewnętrzny 400 ng

Background Subtract File: C: Tia 1 Date: November 5-2002 11:08:32
 Comment: Fig A. – Widmo masowe dla 8- α -hydroksymutyliny – PFP wzorzec
 Averagr of : 1131 to 1131 Minus : 1128 to 1128 100 % = 1505



Ryc. 6. Widmo masowe dla 8- α -hydroksymutyliny – markera pozostałości tiamuliny

prawność wstępnego procesu obróbki tkanek przy oznaczaniu poziomu zawartości tiamuliny i jej metabolitów w organizmie zwierzęcym. Spektrometria mas (MS) jest jedną z najskuteczniejszych metod analizy jakościowej i analizy strukturalnej związków organicznych, a także odgrywa znaczącą rolę w ilościowej analizie śladów różnych związków.

Połączenie chromatografii gazowej ze spektrometrią mas stworzyło jedno z najbardziej skutecznych narzędzi w analizie skomplikowanych mieszanin związków organicznych, gdyż chromatograf gazowy rozdziela mieszaniny i wprowadza do spektrometru mas czyste związki o odpowiedniej lotności, z szybkością dostosowaną do szybkości procesów zachodzących w MS. Natomiast spektrometr mas identyfikuje dany związek (pełni zatem funkcję detektora jakościowego) i oznacza poszczególne składniki ilościowo (12).

Każda nowa metoda badawcza wymaga przeprowadzenia procesu walidacji w laboratorium wykonującym dane oznaczenia. Taka procedura pozwala skutecznie ocenić trafność w doborze odczynników chemicznych, dostroić aparaturę analityczną oraz dokonać modyfikacji w metodzie podyktowanych specyfiką ośrodka badawczego.

Wg zaleceń EMEA, poziom pozostałości tiamuliny u świń należy przeprowadzić na dwóch tkankach wskaźnikowych – wątrobie i mięśniach (7). Natomiast procedury opisane w metodzie Marcus i Sherma, na które powołują się organizacje odpowiedzialne za rejestrację leków, dotyczą oznaczania fluorowcopochodnych metabolitów tiamuliny tylko w wątrobie świń. Z tego powodu zaistniała konieczność adaptacji i sprawdzenia przydatności ww. metody w stosunku

do tkanki mięśniowej. Metodę walidacji dla mięśni przeprowadzono na 30 g homogenatu tkanki, dodając takie same ilości markera pozostałości tiamuliny jak w przypadku wątroby. Analiza GC próbek mięśni dowiodła, że próbki sporządzone z takiej samej ilości tkanki (30 g), jak próbki z wątroby, dają zbliżone pod względem pola powierzchni piki. Tkanka mięśniowa przeszła taki sam wstępny proces przygotowania do analizy za pomocą GC. W trakcie badań stwierdzono, że podczas etapu głębokiego wymrażania, mającego za zadanie usunięcie tłuszczu, z próbek mięśni wytrąca się jego większa ilość. Dlatego też proces wymrażania (-80°C) wydłużono z 10 do 20 min.

Metoda wg Marcus i Sherma (9) mówi o dowolności w zastosowaniu powietrza bądź azotu podczas usuwania par rozpuszczalników z kolb po procesie odparowywania. Podczas badań stwierdzono jednak, że zastosowanie powietrza do ww. celu, niekorzystnie wpływało na dalsze etapy przygotowania próbek do analizy tzn. etap de-rywatywacji. Związane było to najprawdopodobniej z zawartością śladowych ilości pary wodnej w stosowanym powietrzu, które uniemożliwia tworzenie fluorowych pochodnych tiamuliny.

Piśmiennictwo

1. Anon.: Freedom of Information Office, Center for Veterinary Medicine, Supplement to NADA 139-472, Environmental Assessment, Denagard® (tiamulin) Premixes, July 1988.
2. Anon.: Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation. FDA, Center for Drug valuation and Research, CVM, May 2001.
3. Anon.: Joint FAO/WHO Expert on Food Additives: Evaluation of certain veterinary drug residues in food. World Health Organisation, Technical Report, Geneva, Series 763 (32), 1988.
4. Anon.: Komisja Rejestracji Środków Farmaceutycznych i Materiałów Medycznych. Materiały, Wyd. I, Warszawa 1997.
5. Anon.: Note for Guidance: Approach Towards Harmonisation of Withdrawal Periods. EMEA/CVMP/036/95-Final, March 1996.
6. Anon.: Note for guidance on the risk analysis approach for residues of veterinary medicinal products in food of animal origin. EMEA/CVMP/187/00-Final, 2001.
7. Anon.: Tiamulin Summary Report (3). Committee for Veterinary Medicinal Products EMEA/MRL/747/00-Final, July 2000.
8. Hibbert D.: Method validation of modern analytical techniques. Accred Qual Assur, 1999, 4, 352-356.
9. Marcus J., Sherma J.: Method IV. Gas chromatographic determination of tiamulin residues in swine liver. J. AOAC Int. 1993, 76, 451-458.
10. Marcus J., Sherma J.: Method V. Gas chromatographic/ mass spectro metric confirmation of 8-hydroxymutillin, a tiamulin metabolite, in swine liver extracts. J. AOAC Int. 1993, 76, 459-460.
11. Piskorska-Pliszczyńska J.: Walidacja metod badawczych – wymagania, zalecenia i praktyka. Medycyna Wet. 2002, 58, 827-831.
12. Rödel W., Wölm G.: Chromatografia gazowa. Wyd. Nauk. PWN, Warszawa 1992.
13. Shah V., Midha K., Findlay J., Hill H., Hulse J., McGilveray I., McKay G., Miller K., Patnaik R., Powell M., Tonelli A., Viswanathan C., Yacobi A.: Bioanalytical method validation – a revisit with a decade of progress. Pharmaceut. Res. 2000, 17, 1551-1557.
14. Trullols E., Ruisanchez I., Ruis F.: Validation of qualitative analytical methods. Trends Anal. Chem. 2004, 23, 137-145.

Adres autora: dr Rafał Zań, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin; e-mail: rafal.zan@ar.lublin.pl