

## Criteri di gestione ed impiego delle tecniche strumentali

Attilio E.G. CREA

*Dipartimento di Farmacocinetica e Metabolismo, Menarini Ricerche, Pomezia, Roma*

**Riassunto.** - La misurazione di parametri - sia essa semplice rilevazione di temperatura o determinazione di pesticidi, controllo di farmaci o rilevazione di inquinanti nell'aria o nell'acqua - deve essere eseguita in modo preciso ed accurato. Dopo l'acquisto dello strumento, con l'*installation qualification* e l'*operation qualification*, entrambi rilasciati dagli esperti dell'azienda costruttrice, si creano le basi per un corretto utilizzo dello stesso. Le procedure operative standard di gestione degli strumenti devono essere sufficientemente dettagliate per permettere all'operatore di utilizzare al meglio lo strumento, ma soprattutto devono contenere tutte le informazioni necessarie per una manutenzione ed una calibrazione corrette. Dal 2002 la FDA non accetterà più fascicoli cartacei, per cui le aziende farmaceutiche, che vogliono registrare in USA, dovranno presentare i fascicoli registrativi in formato elettronico. Questo comporterà la validazione di tutti i software di gestione degli strumenti. Si può prevedere che anche l'EMEA seguirà a breve la FDA, per cui la validazione dei sistemi informatici di gestione degli strumenti diventerà la norma, aprendo così nuove problematiche sia per gli operatori che per gli ispettori.

*Parole chiave:* buona pratica di laboratorio, calibrazione, cromatografia liquida, spettrometria di massa-massa, validazione.

**Summary** (*Criteria for management and use of instrumental techniques*). - The measurement of various parameters - be it plain temperature readings or determination of pesticides, drug monitoring or measurement of contaminants in air or water - must be carried out precisely and accurately. After purchase of the instrument, the installation qualification and the operation qualification, both produced by experts in the manufacturing company, are used to ensure correct use of the instrument. The standard operating procedures for instrument management must be sufficiently detailed to allow the operator to use the instrument correctly and, above all, must contain all the information necessary for accurate and precise calibrations. From 2002, the Food and Drug Administration will no longer accept submission of paper dossiers, so that pharmaceutical companies wishing to register a product in the USA will be obliged to submit the dossier electronically. This will involve the validation of all the software used in the management and operation of all instruments. It can be assumed that the EMEA will shortly follow the FDA, so that the validation of instrument software systems will become the rule and create new responsibilities for operators and inspectors.

*Key words:* good laboratory practice, calibration, liquid chromatography, mass-mass spectrometry, validation.

### Introduzione

La precisione, l'accuratezza e la sensibilità di una misurazione analitica dipendono in gran parte dagli strumenti che vengono utilizzati per generare la misurazione. Indipendentemente dal settore di lavoro, lo strumento di rivelazione influenza in modo significativo la precisione, l'accuratezza e la sensibilità della misurazione. Per questo motivo la buona pratica di laboratorio (BPL) considera fondamentale, per i sistemi di saggio, la manutenzione e la appropriata gestione degli strumenti. In questo lavoro vengono esaminate le tematiche concernenti la corretta gestione e manutenzione degli strumenti, in particolare per quel che riguarda la cromatografia liquida ad alte prestazioni con rivelatore massa-massa (HPLC-MS/MS nell'acronimo inglese).

### Procedure di gestione

La necessità di una particolare misurazione determina l'acquisto dello strumento ed è proprio in questa fase molto precoce che il laboratorio deve valutare i servizi necessari per l'apparecchiatura, quali gli allacciamenti a elettricità, gas, aria compressa od altro. È anche indispensabile sapere per tempo quali sono le condizioni ideali per il corretto funzionamento dello strumento, in particolare spazio necessario, umidità relativa e temperatura. Per regolare quest'ultima, è indispensabile conoscere la quantità di calore generato dallo strumento. Diventa quindi indispensabile all'atto dell'acquisto chiedere alla ditta costruttrice tutte le informazioni tecniche e di sicurezza relative all'apparecchiatura.

Sistemato lo strumento in laboratorio, hanno inizio le prove della casa costruttrice che si completano con l'*installation qualification* per confermarne l'avvenuta e corretta installazione. Contemporaneamente all'arrivo dello strumento viene preparata una scheda di manutenzione (cartacea o elettronica) che dovrà seguire l'apparecchio fino alla sua dismissione. In questa scheda saranno riportate, oltre all'avvenuta installazione, tutte le operazioni di manutenzione ordinaria e non, eventuali guasti, calibrations ed ogni altra osservazione concernente il funzionamento dello strumento. L'apparecchio deve essere inserito nella lista (database) degli strumenti utilizzati dal laboratorio. Sia la scheda che la lista degli strumenti sono richiesti dai principi di BPL. Esse, di conseguenza, devono essere preparate e regolarmente aggiornate.

La fase di addestramento dell'operatore all'uso dell'apparecchio è più o meno lunga e dipende dalla complessità dello strumento. Generalmente, per strumenti sofisticati con sistemi complessi di software, essa può durare anche qualche settimana. Questa fase di addestramento avviene sotto la direzione dei tecnici della casa costruttrice. Un'ulteriore fase di approfondimento viene eseguita in proprio ed in stretto contatto con l'azienda produttrice. Con l'attestato di *operation qualification* la ditta costruttrice conferma la validità dello strumento a svolgere determinate misurazioni e contemporaneamente attesta che gli operatori del laboratorio sono in grado di gestire e utilizzare in modo corretto lo strumento.

Con l'emissione della procedura operativa standard (POS), lo strumento può essere utilizzato per studi secondo BPL. Questa procedura deve essere semplice e contemporaneamente permettere un utilizzo corretto dello strumento. Più lo strumento è complesso e più diventa difficile gestire lo stesso con una semplice procedura. Diventa quindi indispensabile redigere la POS in modo dettagliato, rimandando per ulteriori approfondimenti al manuale d'uso dello strumento. Con l'emissione della POS incomincia il percorso lavorativo dello strumento.

#### **Cromatografia liquida ad alte prestazioni - spettrometria di massa-massa (HPLC-MS/MS)**

L'introduzione della tecnica HPLC-MS/MS nei laboratori analitici ha aumentato notevolmente le potenzialità dei laboratori stessi. Essa combina la cromatografia ad alte prestazioni con la sensibilità e specificità che sono tipiche della spettrometria di massa. Con l'aiuto di questi strumenti è possibile misurare concentrazioni nell'ordine dei  $\text{pg ml}^{-1}$  in liquidi biologici o altra matrice. Lo strumento tipo consiste in una pompa, un autocampionatore, una colonna per la separazione

ed un rivelatore, che può essere uno spettrometro a singolo o doppio quadrupolo. Quest'ultimo misura il peso molecolare della molecola in esame ed il peso molecolare del principale ione "figlio" che si ottiene dalla molecola stessa. Si raggiunge così una specificità eccellente che permette di evitare i problemi di matrice, tipici di queste misurazioni.

La gestione di strumenti come l'HPLC-MS/MS, ad alto contenuto tecnologico, richiede da parte del laboratorio un maggior sforzo di preparazione per le procedure che regolano sia la manutenzione ordinaria che la straordinaria. Infatti, si stipulano contratti di manutenzione con la casa costruttrice che permettono di avere, ogni qualvolta sia necessario, l'intervento di un tecnico specializzato che provvede in tempi rapidi a ripristinare l'operatività dello strumento. Nonostante questi interventi di manutenzione e calibrations dello strumento da parte della casa costruttrice è buona norma, prima di iniziare un'analisi, verificare l'operatività dello strumento.

#### **Parametri per verificare la funzionalità dello strumento**

Le prove che vengono effettuate per verificare la funzionalità degli strumenti sono riportate nei vari manuali, dato che la cromatografia ad alte prestazioni è una tecnica molto usata che ha ormai raggiunto una grande maturità tecnica.

Per la pompa, i parametri che servono a verificare il funzionamento sono la riproducibilità del flusso, la precisione del flusso, il rumore della linea di base, la riproducibilità nel creare un gradiente ed i saggi di pressione e calcolo del volume morto. Le prove per gli iniettori automatici sono la riproducibilità nell'iniettare, la precisione dell'iniezione e la misurazione dell'effetto memoria. La colonna cromatografica viene provata misurando la forma, la simmetria e il tempo di ritenzione del picco, nonché calcolando il numero dei piatti teorici. La funzionalità di un rivelatore (ultravioletto) viene determinata tramite il rumore di base, il rapporto segnale/rumore, la precisione della lunghezza d'onda, la linearità di risposta e l'energia della lampada. Se il rivelatore è uno spettrometro di massa viene controllata la precisione del peso molecolare, la linearità di risposta e il rapporto picco/rumore. Il software di gestione dello strumento viene verificato valutando l'integrazione dei picchi e facendo una prova di comunicazione (comando e risposta).

Queste prove sul sistema vengono condotte con regolarità ad intervalli più o meno lunghi, dipendenti dall'utilizzo dello strumento. Infatti, se lo strumento viene utilizzato giornalmente, le prove sopra indicate sarebbe bene venissero eseguite una o due volte al mese [1].

### Determinazioni analitiche

La quantità di liquidi biologici a disposizione per un'analisi è per motivi etici generalmente esigua. Per evitare sprechi di materiale è buona pratica sincerarsi, prima di iniziare una seduta d'analisi, che lo strumento dia una corretta misurazione. La verifica che deve essere eseguita quindi giornalmente consiste nel determinare la concentrazione di alcuni standard di riferimento. Se la forma, l'area e il tempo di ritenzione del picco si mantengono costanti e sono paragonabili ai dati ottenuti in precedenza, questo è un indice di buon funzionamento del sistema nel suo insieme, nonché dell'iniettore automatico, della colonna, della pompa, del rivelatore e del software di gestione.

E' opportuno inoltre, come previsto dalle normative internazionali, l'inserimento nel ciclo d'analisi della curva di taratura e dei controlli di qualità. La curva permetterà di determinare la concentrazione dei campioni incogniti, mentre i controlli di qualità rileveranno la funzionalità dello strumento durante l'analisi [2, 3].

### Dati originali

Attualmente, una misurazione diventa dato originale nel momento in cui viene stampata su carta. Per la preparazione di un fascicolo registrativo di un nuovo farmaco questi dati devono essere messi a disposizione dell'autorità regolatoria. Con la nuova direttiva della Food and Drug Administration (FDA), dal 2002 le aziende che vogliono registrare un nuovo farmaco negli Stati Uniti d'America devono presentare il fascicolo registrativo in formato elettronico. Di conseguenza, scomparirà il dato originale cartaceo e questo sarà sostituito da un dato elettronico, compresa la firma elettronica, come previsto dal *Code of Federal Register* (CFR) 21, part 11.

Questo sviluppo metterà a dura prova la capacità lavorative delle aziende in quanto diventerà obbligatorio validare il software di gestione dello strumento e di generazione dei dati. In Europa la European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (EMA) non ha ancora preso alcuna decisione, ma tutto lascia prevedere che essa si adeguerà alla norma FDA. Per le aziende, quindi, comincia un conto alla rovescia per adeguarsi

alle nuove richieste. Attualmente è possibile con i vari sistemi LIMS (Laboratory Information Management Systems) presenti sul mercato seguire il campione da analizzare dal momento in cui viene prelevato fino all'analisi, compresa la redazione del rapporto. Tutto questo processo deve però essere validato in modo da verificare che durante la generazione e trasmissione del dato non ci siano delle anomalie che possano inficiare il dato originale.

Anche l'archiviazione dei dati sarà rivista alla luce delle nuove direttive. Tutte le informazioni, dalla copia del software ai manuali d'uso degli strumenti utilizzati per la generazione dei dati, devono essere archiviate per un periodo che è compreso tra un minimo di dieci anni ed un massimo di venti. Nel caso di dati elettronici essi devono essere archiviati insieme al sistema elettronico che li ha generati in modo da poter essere disponibili in qualsiasi momento.

### Conclusioni

La gestione degli strumenti ed il loro corretto utilizzo è sempre stato un punto di forza di qualsiasi determinazione analitica. L'avanzare delle nuove tecnologie informatiche e le esigenze degli enti regolatori stimoleranno ancora di più le aziende a migliorare i processi di gestione degli strumenti con conseguente miglioramento della qualità dei dati prodotti che alla lunga potrebbe tradursi in un notevole vantaggio economico.

Lavoro presentato su invito.  
Accettato il 13 novembre 2001.

### BIBLIOGRAFIA

1. Maldener G. Requirement and test for HPLC apparatus and methods in pharmaceutical quality control. *Chromatographia* 1989;28:85-8.
2. Dadgar D, Burnett PE, Choc MG, Gallicano K, Hooper JH. Application issues in bioanalytical method validation sample analysis and data reporting. *J Pharm Biomed Anal* 1995;13(2):89-97.
3. US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER). *Guidance for industry. Bioanalytical methods validation for human studies*. FDA; December 1998.