

Ocena podobieństwa profili uwalniania

Praktyczna statystyka dla farmacji

Michał Iwaniec

Specjalista działu technicznego StatSoft Polska, wdraża w firmach farmaceutycznych rozwiązania bazujące na oprogramowaniu STATISTICA

Mirosław Popieluch

Kierownik działu sprzedaży StatSoft Polska odpowiedzialny za współpracę z sektorem farmaceutycznym



W codziennej pracy specjalistów firm farmaceutycznych pracujących w działach zapewnienia jakości, kontroli jakości czy zarządzania produkcją coraz więcej czasu zajmuje żmudna praca związana z przygotowaniem raportów dotyczących przebiegu procesów produkcyjnych. Z jednej strony odpowiedzialne za to są rosnące wymagania rynku i przyjęte przez branżę standardy, z drugiej strony coraz bardziej rygorystyczne normy narzucone przez organy regulacyjne.

Większość analiz, porównań, zestawień i raportów, które należy wykonywać okresowo dla celów kontrolnych i dokumentacyjnych wymaga znajomości technik statystycznej analizy danych, umiejętności wykonywania analiz statystycznych i wyciągania na ich podstawie wniosków. W związku z tym, że większość tego typu raportów to rutynowo wykonywane według szablonu dokumenty, do tego celu doskonale nadają się dedykowane rozwiązania informatyczne, np. STATISTICA Zestaw Farmaceutyczny. Na podstawie przygotowanych danych program automatycznie przygotowuje gotowy do wydruku raport podsumowujący wyniki analiz w postaci wykresów i tabel, a dodatkowo zawiera wnioski z przeprowadzonej analizy. Zastosowanie takiego rozwiązania pozwala na ogromną oszczędność czasu, a dodatkowo fakt, że jest ono walidowane, gwarantuje poprawne wykonanie analiz i raportów.

Wymagania i dane

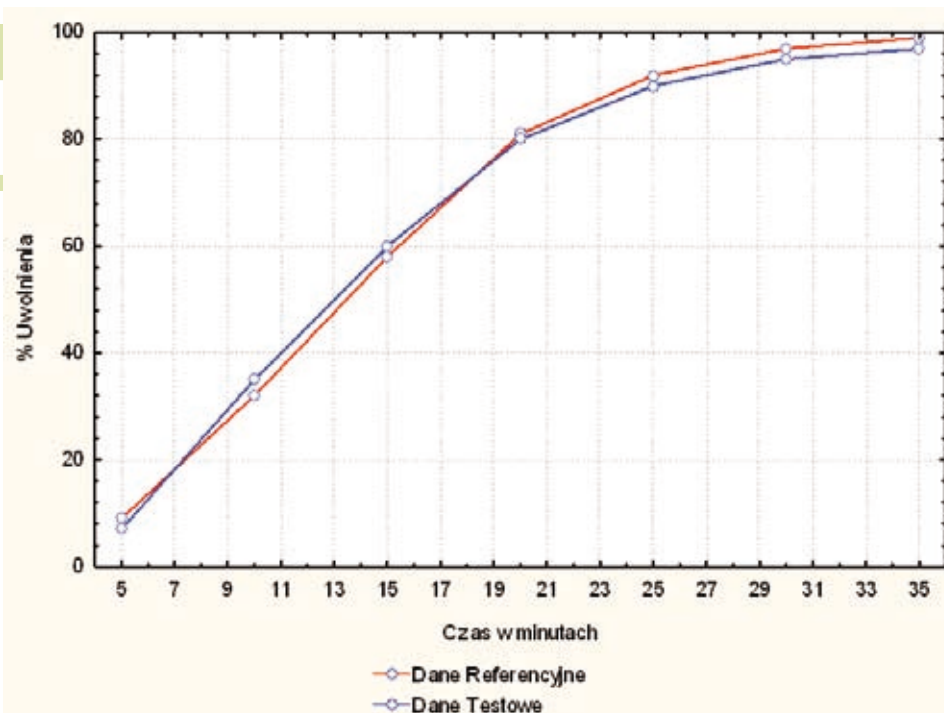
Proces analizy danych, o którym będzie mowa w artykule, sprowadza się do odpowiedzi na pytanie, czy krzywe (profile) uwalniania, np. substancji czynnej dla tabletek pochodzących z dwóch różnych źródeł, są porównywalne. Analityk, przeprowadzający badanie, dysponuje zazwyczaj dwoma zbiorami danych: zebranymi dla leku referencyjnego i dla leku testowego, dla którego będziemy chcieli wykazać podobieństwo do leku referencyjnego. FDA

w przewodniku [1] daje wytyczne odnośnie układu danych, który powinien zostać wykorzystany w trakcie doświadczenia, jak również przytacza metody statystyczne, które powinny być wykorzystane dla tego zagadnienia. Zbiory danych, które są wykorzystywane w trakcie doświadczenia, powinny mieć identyczny układ. Dla każdego punktu w czasie powinna zostać oznaczona wartość uwalniania dla takiej samej liczby tabletek, która zazwyczaj wynosi 12. Badanie powinno składać się z co najmniej dwóch punktów czasowych. Wyjątek stanowią produkty, dla których uwolnienie zachodzi od razu.

Dlaczego do porównania profili uwalniania wykorzystywane są techniki statystyczne? Bierze się to ze specyfiki pomiarów, które obarczone są nierzadko dużą zmiennością, zwłaszcza w przypadku szybkiego uwalniania. Mamy więc do czynienia ze zmiennością, którą możemy opisać jedynie w sposób statystyczny. Ponadto trudno oczekiwać, że przeprowadzając kilkakrotnie doświadczenie dla tego samego produktu, otrzymamy zbiór identycznych danych. Powoduje to, że jeżeli narysujemy wykresy wartości średnich otrzymanych w poszczególnych punktach czasowych, to nie będą one się pokrywać (będą różne). Zatem niezbędny jest test statystyczny, który z określonym prawdopodobieństwem odpowie na pytanie, czy różnice pomiędzy profilami w stosunku do zmienności, jaką wykazują, są istotne.

Wykres wygenerowany w programie STATISTICA

Obok znajduje się przykładowy wykres porównujący przebieg uwalniania substancji, który został stworzony w oparciu o dane zebrane dla leku referencyjnego i testowanego. Wprawne oko zauważy, że pomiędzy profilami nie ma istotnych różnic, jednak należy wykazać to, używając formalnego testu.



Testy statystyczne

Podobnie jak w przypadku innych zagadnień, w których wykorzystywane są testy statystyczne, można zaproponować bardzo wiele metod, które będą oceniać podobieństwo profili. W wytycznych FDA [1] zaproponowane zostały dwa ogólne podejścia: niezależne i zależne od modelu.

Pierwszą i najbardziej rozpowszechnioną metodą jest metoda czynników różnicy i podobieństwa. W metodzie tej obliczane są odpowiednio czynniki f_1 i f_2 . Im mniejsza różnica (wartość f_1) i im większe podobieństwo (wartość f_2), tym większe jest prawdopodobieństwo, że dwie krzywe uwalniania nie różnią się istotnie. Metoda ta nie jest w żaden sposób uzależniona od kształtu porównywanych krzywych uwalniania, a jedynie od skumulowanych odchyłek pomiędzy profilami w kolejnych punktach. Zobaczmy, jakie wyniki dały obliczenia dla pokazanego wyżej przykładowego przypadku:

$$f_1=2,95 \text{ i } f_2=82,06$$

Aby uznać profile za podobne, przyjmuje się, że czynnik f_1 powinien być mniejszy od 20, natomiast czynnik f_2 większy od 50. Ogólnie im mniejsza różnica (f_1) i im większe podobieństwo (f_2), tym łatwiej wykazać podobieństwo profili. Dokładniej zachowanie powyższych wskaźników zostało opisane w artykule [2].

Pomimo tego, że wykorzystanie tej metody nie zależy od kształtu linii profilu, to dane, które będą analizowane, muszą spełnić kilka założeń, aby wynik otrzymanego testu był wiarygodny. Przede wszystkim zmienność w obrębie poszczególnych punktów czasowych nie powinna być zbyt duża, tzn. współczynnik zmienności nie powinien być większy od 15%. Ponadto w analizie nie powinno być uwzględnionych więcej niż jeden punkt powyżej 85% wartości uwolnienia. Pierwsze z założeń wymusza na badaczu odpowiednią jakość danych, która to zależy m.in. od jakości pomiaru. Drugie założenie wymusza natomiast obcięcie profilu w miejscu, gdzie pro-

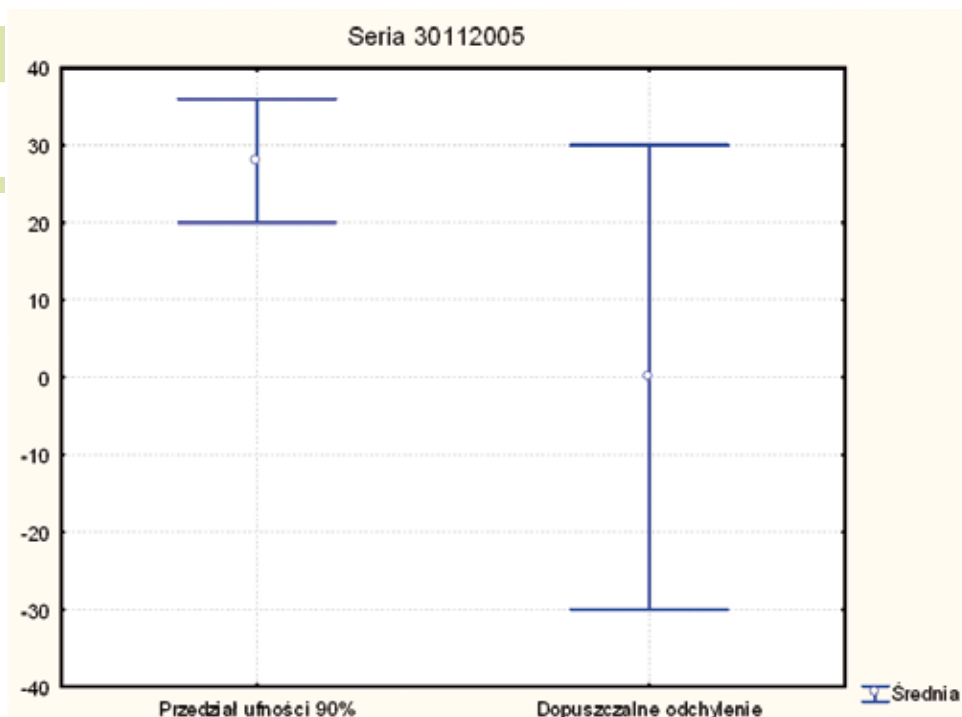
ces uwalniania w zasadzie zatrzymał się, i uwzględnianie dalszych punktów czasowych nie ma sensu. Zauważmy, że od pewnego poziomu uwolnienia, w granicach 85-100%, profile są praktycznie równoległe do osi czasu i większość różnic, jakie zostaną zaobserwowane, będzie wynikać z niepewności pomiaru. Zatem biorąc odpowiednią liczbę takich punktów, będzie możliwe wykazanie podobieństwa nawet tych profili, które wykazują duże różnice w najbardziej interesującym zakresie 0-85% uwolnienia.

Drugie założenie jest łatwe do spełnienia, natomiast jeżeli zmienność danych będzie zbyt duża, wtedy FDA proponuje inną metodę, opartą na wielowymiarowej analizie danych. W wytycznych nie został podany konkretny sposób obliczeniowy, a jedynie ogólne założenia, które metoda powinna spełnić:

- Należy wyznaczyć kryterium akceptacji, które będzie odpowiednie dla wielowymiarowej odległości i będzie porównywalne ze zmiennością wewnątrz danych otrzymanych dla próby referencyjnej.
- Należy wyznaczyć wielowymiarową odległość pomiędzy wartościami średnimi dla kolejnych punktów czasowych z danych referencyjnych i testowych.
- Należy obliczyć 90% przedział ufności dla powyższej odległości.
- Należy porównać obliczony limit z kryterium akceptacji. Dwa profile uznajemy za podobne, jeżeli górna granica wspomnianego przedziału ufności jest mniejsza lub równa kryterium akceptacji.

Pierwszą i zarazem najbardziej istotną różnicą pomiędzy tą metodą a metodą czynników różnicy i podobieństwa jest sposób wyznaczania kryterium akceptacji. W poprzedniej metodzie wartości kryteriów akceptacji są narzucone z góry, natomiast w tej metodzie zależą od zmienności, jaką charakteryzuje się referencyjny zbiór danych. „Wielowymiarowość” tego podejścia może powodować trudności w zrozumieniu, dlatego warto przytoczyć prosty przykład z dziedziny

Wykres wygenerowany w programie STATISTICA



analizy pomiarowej, który jest analogiczny do opisanego.

Założmy, że chcemy porównać nowo opracowaną metodę analityczną polegającą na oznaczaniu zawartości alkoholu etylowego w wodzie z dotychczas znaną i stosowaną metodą. Wykonujemy więc np. 10 oznaczeń wzorcowego roztworu o zawartości 10% alkoholu przy użyciu obu metod. Obliczamy następnie wartości średnie z obydwu pomiarów, odchylenia standardowe w obu zbiorach i na tej podstawie możemy określić przedział ufności dla różnicy pomiędzy tymi średnimi, np. 90%. Innymi słowy znajdujemy przedział, w którym różnica pomiędzy średnimi po wykonaniu identycznego doświadczenia powinna znaleźć się z prawdopodobieństwem równym 0,9. Teraz górną granicę tego przedziału możemy porównać do pewnej wartości. Wartość tę można wyznaczyć jako procent zmienności danych w zbiorze dla dobrze poznanej metody. Jeżeli więc górna granica przedziału ufności dla różnicy średnich wynosi przykładowo 0,34, natomiast relatywna zmienność w referencyjnym zbiorze danych wynosi 5% (odchylenie standardowe podzielone przez wartość średnią i pomnożone przez 100%), to brak różnicy pomiędzy metodami zostanie wykazany, gdyż $0,34 < 0,5$. Tak więc im większa jest zmienność w referencyjnym zbiorze danych, tym łatwiej będzie udowodnić podobieństwo.

Kolejnym wyróżnikiem metody opartej na wielowymiarowej analizie danych jest zastosowanie o wiele bardziej skomplikowanych obliczeń. W przypadku tej metody nie ma „tylnej furtki”, która upraszcza obliczenia. Musimy zastosować tu rachunek macierzowy w połączeniu z odpowiednią teorią statystyczną, która narzucona jest przez fakt, że kolejne punkty czasowe w profilu uwalniania zależą od siebie. Mamy tu do czynienia z autokorelacją, która w teorii jest uwzględniana w tak zwanej przestrzeni Mahalanobisa. Dokładnie metoda ta jest opisana w pracy [3].

Jeżeli jednak obliczenia zostaną już wykonane, samo wnioskowanie na temat podobieństwa profili jest tak samo proste, jak w przypadku czynników f_1 i f_2 . Poniżej znajduje się przykładowy rysunek pokazujący, jak przedział ufności ma się do dopuszczalnego odchylenia. W tym przypadku przedział ufności nie zawiera się w dopuszczalnym odchyleniu w związku z czym profile są różne.

Trzecią grupą sugerowanych przez FDA metod są tak zwane metody zależne od modelu. Zależne od modelu, tzn. że będziemy chcieli opisać kształt profilu za pomocą krzywej teoretycznej. FDA sugeruje tutaj kilka funkcji, w tym

funkcję Weibulla, a konkretnie funkcję dystrybuanty rozkładu Weibulla. Ma ona następującą postać:

$$m = m_{\infty} \left(1 - e^{-\left(\frac{t}{t_d}\right)^{\beta}} \right)$$

gdzie m jest procentem uwolnienia, m_{∞} jest asymptotą uwolnienia (100%), t jest czasem, natomiast pozostałe wartości są parametrami.

Stosując metodę zależną od modelu, należy do każdego profilu cząstkowego (zazwyczaj mamy ich 12) wyznaczyć parametry funkcji teoretycznej, które zapewnią najlepsze dopasowanie. Powstaje tu więc problem optymalnego doboru parametrów, który można sprowadzić do dobrze znanego i opisanego zagadnienia regresji liniowej. Metodę regresji liniowej możemy zastosować po odpowiednim przekształceniu (zlinearyzowaniu) danych. Podana powyżej postać funkcji po obustronnym logarytmowaniu sprowadza się do postaci liniowej. Pozwala to na odnalezienie grupy współczynników t_d dla zbioru testowego i referencyjnego.

Ostatecznie w oparciu o tak otrzymane dane pozostaje przeprowadzić test istotności różnic. Podobnie jak we wcześniejszej metodzie, FDA mówi, aby określić 90% przedział ufności dla różnicy pomiędzy dwoma profilami i porównać go do wyznaczonego w oparciu o zmienność parametrów dla zbioru referencyjnego kryterium akceptacji. Istotność różnicy pomiędzy wartościami średnimi dla dwóch zbiorów parametrów można potwierdzić lub zaprzeczyć, używając testu t lub analizy wariancji przy założeniu standardowego poziomu istotności 0,05.

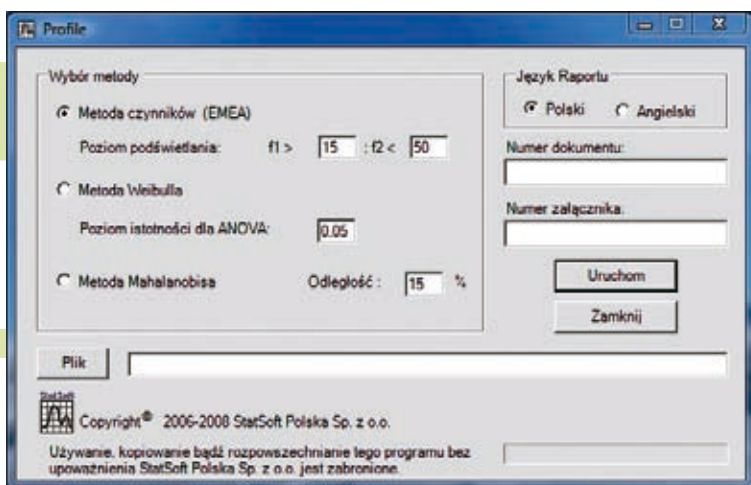
Pierwsza metoda oceny podobieństwa profili uwalniania jest w miarę prosta i przejrzysta, przy czym do wykonania obliczeń dobrze jest wykorzystać odpowiednie narzędzie dedykowane do analiz statystycznych. Pozostałe dwie metody są skomplikowane obliczeniowo, a dodatkowo wytyczne FDA są tylko ogólne

i nie podają żadnych konkretnych technik, a jedynie pewne wskazówki. Jednak zastosowanie tych metod jest konieczne, jeżeli nie zostaną spełnione wymagania dotyczące zbioru danych. Doświadczony analityk, obeznany z technikami statystycznej analizy danych, powinien poradzić sobie z wykonaniem analiz zgodnie z każdą z opisanych metod. Pozostaje jednak kwestia posiadania odpowiednich narzędzi statystycznych, a przede wszystkim pracochłonności opracowywania dziesiątków raportów przygotowanych według wspólnego szablonu. Wszystkie opisane metody analityczne zostały zaimplementowane w jednym z modułów dedykowanego rozwiązania *STATISTICA Zestaw Farmaceutyczny: STATISTICA Profile Uwalniania*.

Zestaw Farmaceutyczny STATISTICA automatycznie wykonuje rutynowe działania związane z analizowaniem danych i tworzy gotowy do wydruku raport. Umożliwia wykorzystanie zaawansowanych metod statystycznych w zadaniach, których wykonanie jest niezbędne dla uzyskania pozwolenia na dopuszczenie do obrotu, zezwolenia na wytwarzanie, walidacji, rocznych przeglądów produktów – zgodnie z wymaganiami polskiego prawa farmaceutycznego.

Praca z programem *STATISTICA Profile Uwalniania* ogranicza się jedynie do wprowadzenia danych, wybrania jednej z omawianych powyżej metod, określenia języka raportu (polski/angielski) i uruchomienia analizy:

Środowisko użytkownika programu *STATISTICA Profile Uwalniania*



Wynikiem działania programu jest gotowy do wydruku raport podsumowujący wyniki analiz w postaci wykresów i tabel oraz zawierający wnioski z przeprowadzonej analizy. Nikogo nie trzeba przekonywać, jak duże oszczędności czasu można uzyskać, stosując rozwiązanie *STATISTICA Zestaw Farmaceutyczny*, sprawdzone już w wielu przedsiębiorstwach farmaceutycznych działających na terenie Polski.

Biorąc pod uwagę specyficzne wymagania stawiane w farmacji systemom informatycznym, rozwiązanie to dostarcza nie tylko z pełną dokumentacją dotyczącą stosowanych metod oraz z przeszkoleniem użytkowników. Dodatkowo wykonywana jest walidacja programu na stanowiskach, na których będzie on wykorzystywany wraz z przygotowaniem odpowiedniej dokumentacji w tym zakresie.

Oprócz modułu *STATISTICA Profile Uwalniania*, w skład *Zestawu Farmaceutycznego STATISTICA* wchodzi: *Ocena Stabilności*, *Walidacja Procesu*, a w przygotowaniu jest moduł do *Analizy Trendów* i *Okresowego Przeglądu Produktów*. Więcej informacji można znaleźć na stronie www.StatSoft.pl/pharma