ODBORNÝ SEMINÁŘ

Kontrola jakosti v laboratoři: analytické metody, specifikace a validace – aktuální požadavky na QC laboratoř podle GMP včetně kontroly nitrosaminových nečistot

Adam Kovalčík,
zástupce vedoucího PAD-QC a projektový koordinátor, QUINTA-ANALYTICA s.r.o.

24. 11. 2026

QUINTA ANALYTICA

MAPA SEMINÁŘE

Šest částí semináře

I.	**Je laboratoř pod kontrolou?**	EU GMP, ICH Q9(R1) a Q10
II.	**Co jsou nitrosaminy?**	Vznik, riziko a požadavky EMA
III.	**Je metoda vhodná pro účel?**	ICH Q14 a Q2(R2): vývoj, validace a praktická úskalí
IV.	**Je specifikace správně nastavená?**	EMA Appendix 1, FDA, přepočet AI na ppm, pravidelnost testování
V.	**Co když je výsledek mimo specifikaci?**	OOS/OOT/OOE, fáze I a II, CAPA
VI.	**Shrnutí**	Klíčové kroky při analýze nitrosaminů

QUINTA ANALYTICA

I. JE LABORATOŘ POD KONTROLOU?

Odpovědnosti a farmaceutický systém jakosti

Nezávislost QC	Organizačně nezávislá na výrobě, s dostatkem kvalifikovaného personálu, prostor, vybavení a zdrojů
Řízená dokumentace	Specifikace, SOP, záznamy, raw data, CoA, kvalifikace a validace musí být dohledatelné
Vzorkování	Schválené postupy, reprezentativnost, identifikace, prevence záměny a kontaminace
Analytické metody	Metody validované anebo ověřené při převzetí (transferovaná metoda); testování pouze podle schválených metod
Výsledky a data	Výsledky, výpočty, přístroj, analytik, kontrola a status; trendování kritických parametrů
OOS/OOT a odchylky	Vyšetření vč. root cause a CAPA; rozsah odpovídá riziku



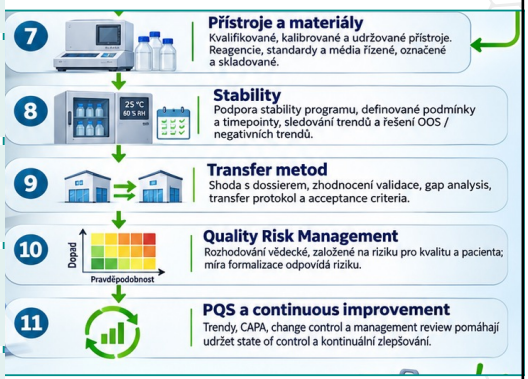
EU GMP: kapitoly 1, 2, 6 a 7. ICH Q9(R1) a Q10.

QUINTA ANALYTICA

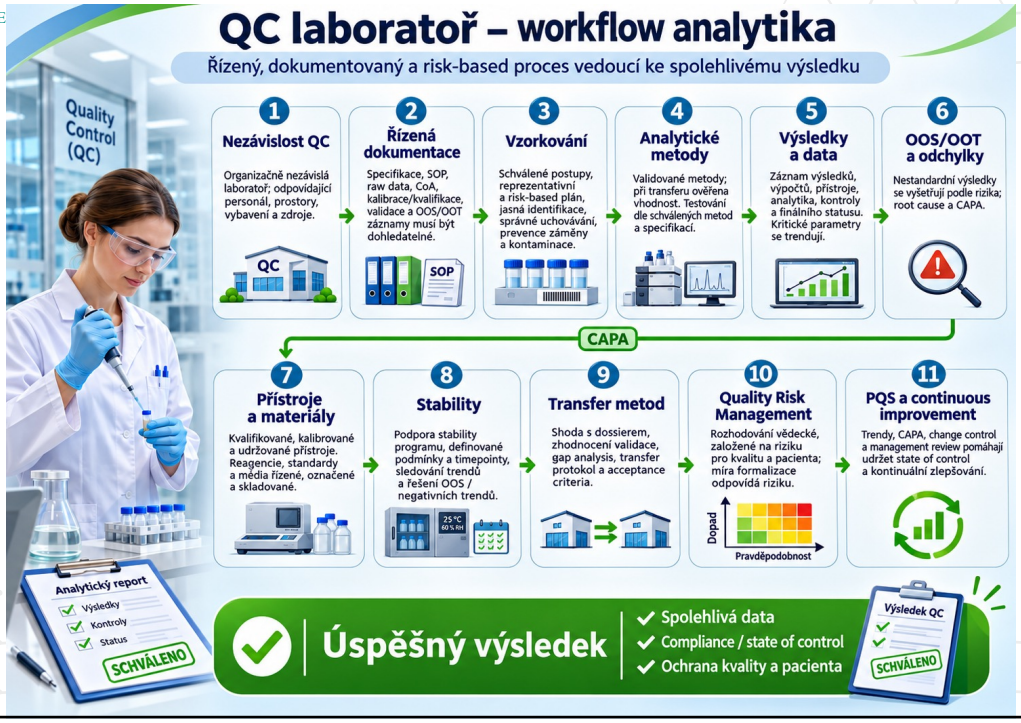
I. JE LABORATOŘ POD KONTROLOU?

Odpovědnosti a farmaceutický systém jakosti

Přístroje a materiály	Kvalifikované, kalibrované, udržované; řízené reagencie, standardy a média včetně expirací
Stability	Průběžný program – Stabilitní plán, definované podmínky a timepointy, trendy, řešení OOS
Transfer metod	Shoda s dossierem, gap analysis, protokol s předem danými akceptačními kritérii
Quality Risk Management	Rozhodování založené na riziku pro kvalitu/pacienta → úměrná dokumentace
PQS a continuous improvement	Trendy, CAPA, change control a management review udržují state of control



QUINTA ANALYTICA

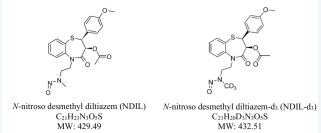


Nitrosaminy: co jsou, jak vznikají a jaké je riziko

Co jsou

N-nitrosaminy obsahují N-nitroso skupinu (N–N=O)

Malé molekuly (NDMA, NDEA) i nitrosaminy podobné API (NDSRIs)



NDIL a NDIL-d3: analyt a značený vnitřní standard

Jak vznikají

1. Sekundární nebo terciární amin (API, zbytky, degradace)
2. + nitrosační činidlo (nitrit, nitrosační látky)
3. Kyselé prostředí, teplo → N-nitrosamin

Vzniká při syntéze, výrobě i skladování



Jaké je riziko

Pravděpodobné lidské karcinogeny (mutagenní látky, ICH M7)

Přípustný příjem v řádu ng/den

Příklady: valsartan 2018, ranitidin 2019 – stahování šarží z trhu

Nutné hodnocení rizika, potvrzovací testování a kontrolní strategie

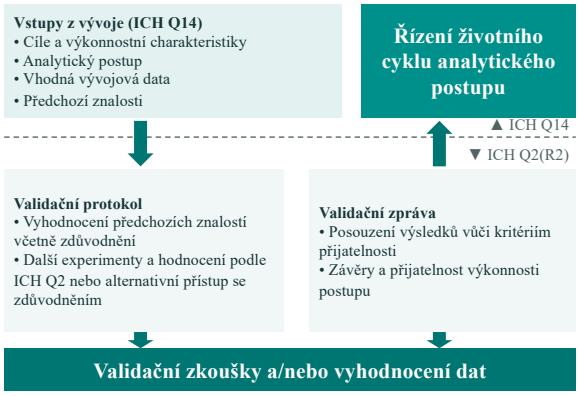
Vývoj, Validace - ICH Q14 a Q2(R2): navazující činnosti

Účel, citliovst a cílová koncentrace analytu určují volbu techniky

Vývoj prověří proveditelnost, rizika, robustnost a kritické body metody

Validační protokol stanoví zkoušky a kritéria předem na základě poznatků z vývoje.

Validační zpráva propojí výsledky, odchylky a závěr



ICH Q2(R2), obr. 1: návaznost vývoje, protokolu a zprávy (schéma překresleno česky)

Schéma převzato z přiloženého ICH Q2(R2). V EU Q2(R2) a Q14 účinné od 14. 6. 2024.

Vývoj metod pro stanovení nitrosaminů

Specifikace produktu

Typ produktu, denní dávka, složení a možné varianty. Počet analytů

Specifikační limit

Volba klienta, anebo výpočet na základě denní dávky účinné látky

Požadavek na citlivost

LoQ dle cíle: rutina ≤ limit; skip-testing ≤ 30 % specifikace; vynechání ≤ 10 % specifikace.

4 pilíře vývoje MS metodik

I. Ionizace
II. Rozpustnost účinné látky
III. Podmínky nástřiku
IV. Chromatografická separace

Vývoj metod pro stanovení nitrosaminů

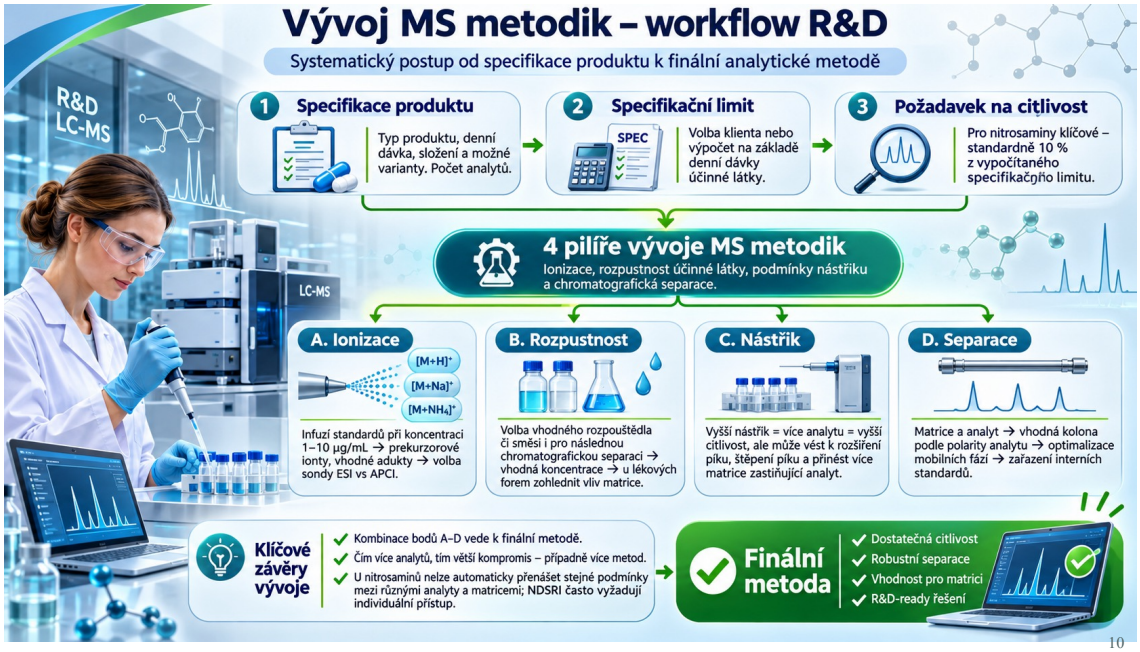
A — Ionizace
Infuze standardů při koncentraci 1–10 µg/mL → prekurzorové ionty, vhodné adukty, MS spektrum → volba sondy ESI vs APCI

B — Rozpustnost
Volba vhodného rozpouštědla či směsi i pro následnou chromatografickou separaci → vhodná koncentrace → u lékových forem se zohledňuje vliv matrice

C — Nástřik
Vyšší nástřik = více analytu = vyšší citlivost, ale může vést k rozšíření píku, štěpení píku. Dále může přinést více matrice zastírající analyt

D — Separace
Matrice a analyt → vhodná kolona (neexistuje univerzální varianta) podle polarity analytu → optimalizace mobilních fází → zařazení interních standardů (kompenzace kolísání odezev vlivem matrice)

Kombinace a kompromis bodů A–D vede k finální metodě.
Čím více analytů, tím větší musí být kompromis – případně více metod.
U nitrosaminů nelze automaticky přenášet stejné podmínky mezi různými analyty a matricemi; zejména NDSRI často vyžadují individuální přístup.



Q2(R2): parametry podle účelu metody

Vlastnost	Identifikace[1]	Kvantifikace nečistot	Limitní zkouška
Selektivita	Ano	Ano	Ano
Kalibrační odezva - Linearita	Obvykle ne	Ano	Obvykle ne
Dolní mez	Dle účelu	QL / LoQ (DL spíše teoreticky)	DL / LoD
Přesnost (mezilehlá přesnost), případně reproducibilita	Obvykle ne	Ano	Ano
Správnost	Obvykle ne	Ano	Obvykle ne
Robustnost	Obvykle ne	Ano	Ano
Stabilita roztoků	Obvykle ne	Ano	Ano

[1]Identifikaci lze podpořit dalším specifickým sekundárním iontem.

Typický výběr podle Q2(R2), nikoli univerzální protokol. QL = LoQ, DL = LoD.

Q2(R2): konkrétní návrh experimentů

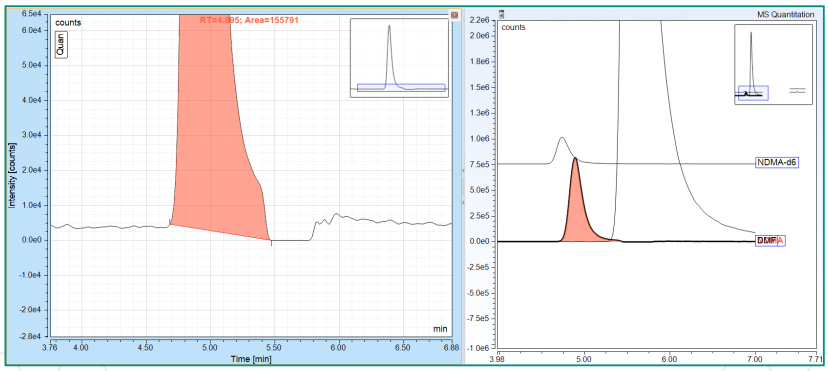
Parametr	Provedení	Příklady kritérií
Linearita	Nejméně 5 koncentrací; rozsah podle analytického účelu	Vhodný kalibrační model - $R \geq 0{,}99$; $\lvert intercept \rvert \leq 15\ \%$; rezidua
Kvantifikační limit / mez detekce	S/N je podpůrné; LoQ ověřit nezávislými přípravami v matrici	LoQ: $S/N \geq 10$ nebo $RSD \leq 15\ \%$[1]; DL: $S/N \geq 3$
Správnost	3 koncentrace × 3 nezávislé přípravy celého postupu	Recovery např. 80–120 %; na LoQ dle koncentrace – může být až 70–130 %
Opakovatelnost	Nejméně 9 stanovení v rozsahu, nebo 6 na 100 % zkušební koncentrace	Předem zdůvodněné RSD (např. ≤ 15 %)
Mezilehlá přesnost	Relevantní změny dnů, analytiků a vybavení	RSD dle účelu; zachytit relevantní zdroje variability (např. ≤ 20 %)
Robustnost	Kritické parametry LC/GC analýzy Příprava vzorků – mletí, doba třepání, extrakční čas **Vychází ze zkušeností vývojářů**	Zachování cílové výkonnosti při přiměřené změně podmínek (vyhodnoceno na standardu i vzorku - Změna výsledku ≤ 20 % oproti nominálním podmínkám)
Stabilita	Stabilita klíčových roztoků standardů, vzorků a případně ISTD pro rutinní QC	Například roztoky standardů 85–115 %; roztoky vzorků 80–120 % (proti $t = 0$)

[1]Některé analyty nevykazují na některých strojích chemický šum a baseline je rovná čára – proto LoQ ověřujeme oproti RSD kritériu.

Praktické příklady a úskalí

Selektivita – řetězec příčin

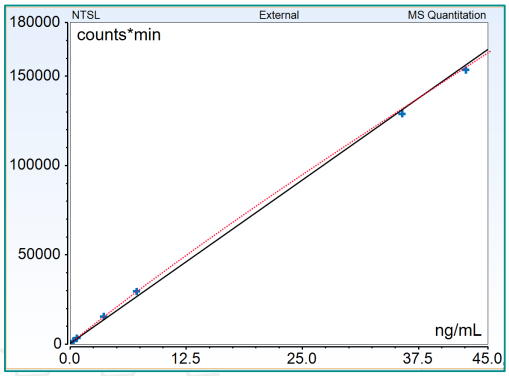
Vysoká koncentrace DMF → **Kompetice během ionizace** → **Zhášení ionizace** → **↓ odezvy NDMA** → **Riziko podhodnocení nebo falešně negativního výsledku**

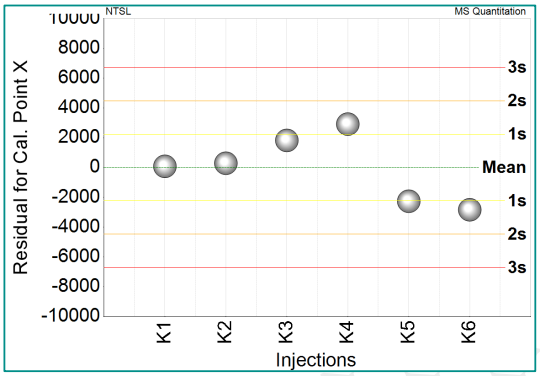


Praktické příklady a úskalí

Široký rozsah může vykazovat nelinearitu

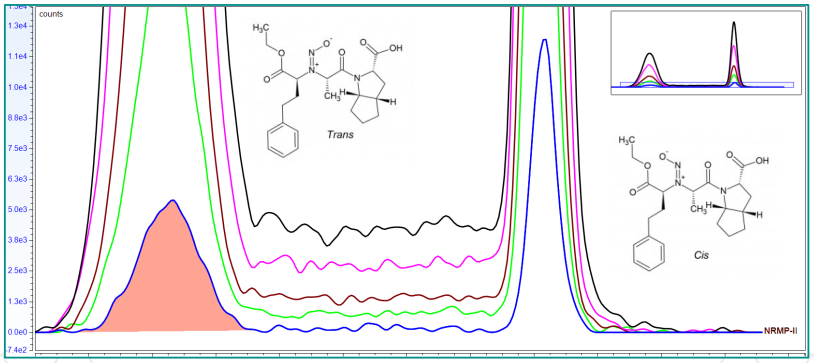
V rozsahu 4,5–535 ppm se odezva při vyšších hladinách zakřivuje. Příčinu (např. saturaci nebo space-charge efekt) je nutné experimentálně ověřit.





Praktické příklady a úskalí

Více konformerů NAMSu	Nitroso-Ramipril (NRMP) existuje ve dvou rotamerech (NRMP-I a NRMP-II), které se během chromatografické separace vzájemně dynamicky přeměňují. Jediná možnost byla integrovat zvlášť (kvůli platu mezi píky) a počítat obsah skrze sumu píků.



Praktické příklady a úskalí

Zapojení ISTD	Vhodný izotopově značený ISTD může omezit vliv matrice a drift přístroje; účinnost kompenzace se musí ověřit.

Matrice	Přístroj	Spolehlivost	Cena
Může korigovat část matricového efektu	Omezuje variabilitu odezvy přístroje	Zlepšuje výkonnost při ověřené shodě chování	Vyšší cena vnitřního deuterovaného standardu

III. JE METODA VHODNÁ PRO ÚČEL?

Praktické příklady a úskalí – variabilita excpientů (zdroje NO_2^-)

Pomocné látky	Přirozené stopové nečistoty a rezidua z výroby; typicky MCC, škroby, HPMC, HPC, povidon.
Výroba excipientů	Chemické zpracování, neutralizace, voda, sušení a další technologické operace.
Technologická voda	Dusitany přítomné ve vodě nebo vznikající při její úpravě.
Chemická syntéza API	$NaNO_2$, alkyl-nitrity a další nitrosační činidla; rezidua ze syntézy či surovin.
Sušení a spaliny	NO_x ze spalování plynu a jiných paliv, zejména při přímém ohřevu sušicího vzduchu.
Recyklované materiály	Kontaminovaná regenerovaná rozpouštědla, reagencie a vstupní materiály.
Chemické přeměny prekurzorů	Oxidace hydroxylaminu či reakce nitroaromátů mohou za určitých podmínek tvořit dusitany.

Řešení: nastavení vhodné matrice pro testování Accuracy

17

QUINTA ANALYTICA

IV. JE SPECIFIKACE SPRÁVNĚ NASTAVENÁ?

Nastavení specifikací: AI a citlivost podle účelu

Vychází z denní dávky

Cmax [ppm] = AI [ng/den] ÷ dávka API [mg/den]

Kategorizace limitů

Vyšší předpokládaná karcinogenní účinnost (CPCA) = nízký AI
Více N-nitrosaminů: kombinované hodnocení rizika (např. Σ expozice/AI ≤ 1)

Kategorie 1	Kategorie 2	Kategorie 3	Kategorie 4	Kategorie 5
EMA: 18 ng/den **FDA: 26,5 ng/den**	EMA: 100 ng/den FDA: 100 ng/den	EMA: 400 ng/den FDA: 400 ng/den	EMA: 1500 ng/den FDA: 1500 ng/den	EMA: 1500 ng/den FDA: 1500 ng/den

Příklady limitů

Nitrosamin	Limit ng/den	Základ v regulačních dokumentech
NDMA	96	Toxikologická data (TD50)
NDEA	26,5	Toxikologická data (TD50)
NDIPA	1500	CPCA, kategorie 5
N-nitroso-desmethyl-diltiazem	100	SAR / read-across z NNK
N-nitroso-tamsulosin	1500	CPCA, kategorie 4
N-nitroso-ramipril	NMI	Negativní in vivo mutagenita, ICH Q3A/B

LoQ podle účelu

Rutinní kontrola	Skip-testing	Vynechání ze specifikace
LoQ ≤ 100 % limitu	LoQ ≤ 30 % limitu*	LoQ ≤ 10 % limitu*

* Nutné i dlouhodobě nízké hladiny, znalost příčiny a zdůvodněná kontrolní strategie (EMA Q&A 9/15).

18

QUINTA ANALYTICA

IV. JE SPECIFIKACE SPRÁVNĚ NASTAVENÁ?

EMA × FDA: limity a důkazy pro stanovení AI

Stav: listopad 2026

SROVNÁNÍ	EMA (EU)	FDA (USA)
CPCA – kat. 1	18 ng/den	26,5 ng/den
Negativní enhanced Ames	AI 1 500 ng/den při splnění podmínek EAT	Pro AI 1 500 ng/den navíc další in vitro test a metabolická data
Negativní in vivo TGR	Možná kontrola podle ICH Q3A/Q3B	Vyšší AI individuálně; Q3A/Q3B není automatické
LTL (léčba ≤ 10 let)	Přístup připuštěn od revize 24 (2026)	Přístup připuštěn od 09/2026; posouzení případu

Odvození a zpřesnění AI: šest vědeckých přístupů

TD50
Historická karcinogenitní data

CPCA
Strukturní predikce karcinogenity

Read-across
Data blízkého analogu

Enhanced Ames Test
Mutagenita in vitro

In vivo TGR
Mutagenita v živém organismu

Benchmark dose (BMD)
Modelování dávky a reakce

CPCA je výchozí model; kvalitní experimentální data mohou převážit jeho predikci. BMD je doplňkový přístup.

QUINTA ANALYTICA

V. VÝSLEDKY MIMO SPECIFIKACI (OOX)

Vyšetřování OOX: rozsah a první kroky

Co je OOX

OOX = OOS + OOT + OOE. Každý nález se šetří a dokumentuje

OOS	OOT	OOE	Ihned
Výsledek mimo specifikační nebo akceptační kritéria	Časově závislý výsledek mimo předpokládaný interval (např. stabilita)	Splňuje specifikaci, ale je mimo očekávanou variabilitu metody	Analytik informuje vedoucího laboratoře a zachová všechny přípravy

QUINTA ANALYTICA

Fáze I: laboratorní šetření

Lhůty	Prioritní: počáteční šetření do následujícího pracovního dne, celé do 3 pracovních dnů. Ostatní: počáteční do 5, celé do 20 pracovních dnů.

Zachovat	Prověřit	Ověřit	Rozhodnout
Vzorky, standardy, roztoky a vialky uchovat do ukončení šetření	Záznamy, trénink, přístroje, audit trail, přípravy a výpočet	Hypotézu o příčině: opakovaný nástřik (REINJ), nová příprava nebo extrakce (REEX)	Laboratorní příčina: zneplatnění a REP. Jinak Fáze II

Fáze II: retest, závěr a CAPA

Fáze II	Je ve spolupráci s klientem. Retest běží podle schváleného plánu ideálně na původním homogenním vzorku.

Analytik A + B	Výsledek	Analytik C	CAPA
Každý min. 2 přípravy, B připraví vlastní standard	Vše v limitu: zapsat všechny výsledky. Selhání B: OOX potvrzen	A selže a B vyhoví: třetí analytik. Selže-li C, OOX potvrzen	Povinná při chybě pracovníka: špatný vzorek, vynechaný krok, porušení postupu či integrity dat

V. VÝSLEDKY MIMO SPECIFIKACI (OOX)

OOS, OOT a atypické výsledky

Proč nitrosaminy	Vznik nitrosaminů vyžaduje vhodný prekurzor a nitrosační podmínky. Rizikovým zdrojem mohou být dusitany z vody, excipientů nebo procesu. (viz slide 17)

OOS	OOE	První reakce	Vyšetřování
U některých produktů může obsah NDSRI během stability růst. Ověřit trend, skladovací podmínky a příčinu tvorby.	Atypický nárůst může vzniknout i při přípravě vzorku (pH, čas, teplota). Samotný kontakt se vzduchem není univerzální příčinou.	Zachovat data a roztoky, informovat odpovědné osoby. Zjištění původu vzorku, skladování a další vnějších vlivů	Ověřit hypotézu, posoudit širší dopad, uzavřít CAPA

Vyhovující opakování samo o sobě neruší původní OOS.

QUINTA ANALYTICA

VI. SHRNUTÍ

Klíčové kroky při analýze nitrosaminů

	Klíčové jsou požadavky na testování dané autoritami

1. Limit a jeho základ	2. Citlivost	3. Metoda	4. Rutina
AI přepočítat podle dávky; u více nitrosaminů zvolit a zdůvodnit kontrolní strategii.	Vycházet z AI, ne z citlivosti stroje. Nejstrategičtější je LOQ ≤ 10 % (EMA Q&A 9).	Poznatky z vývoje – aplikace ve validaci, pokrytí kritických bodů a konzistetní monitoring metody.	Monitoring dat, důraz na správnou přípravu vzorku, původ vzorků

QUINTA ANALYTICA

PŘÍLOHA

Seznam zkratek

Regulace a kvalita

GMP – správná výrobní praxe
EU – Evropská unie
EMA – Evropská agentura pro léčivé přípravky
FDA – americký Úřad pro potraviny a léčiva
CDER – FDA Center for Drug Evaluation and Research
ICH – Mezinárodní rada pro harmonizaci
ICH Q2(R2) – validace analytických postupů
ICH Q3A/B – nečistoty v API / přípravcích
ICH Q6A – specifikace a zkušební postupy
ICH Q9(R1) – řízení rizik pro kvalitu
ICH Q10 – farmaceutický systém jakosti
ICH Q14 – vývoj analytických postupů
ICH M7 – mutagenní nečistoty
Q&A – otázky a odpovědi
QC – kontrola jakosti
QA / QAU – zajištění jakosti / jednotka QA
QP – kvalifikovaná osoba
PQS – farmaceutický systém jakosti
SOP – standardní operační postup
CoA / AR – analytický certifikát / zpráva
CAPA – nápravná a preventivní opatření
LIMS – laboratorní informační systém
API – účinná látka

Nitrosaminy a toxikologie

NDMA – N-nitrosodimethylamin
NDEA – N-nitrosodiethylamin
NDIPA – N-nitrosodiisopropylamin
NDIL – N-nitroso-diltiazemová nečistota
NDIL-d3 – deuterovaný značený standard NDIL
NDSRI – nitrosamin příbuzný účinné látce
NRMP – N-nitroso-ramipril
NAMS – nitrosamin
NNK – nicotine-derived nitrosamine ketone
NMI – non-mutagenic impurity, nemutagenní nečistota
AI – přijatelný denní příjem (ng/den)
CPCA – kategorizace karcinogenní potence
TD50 – dávka s nádory u 50 % zvířat
SAR – vztah struktury a aktivity
EAT – Enhanced Ames Test
TGR – transgenní hlodavci (mutagenita in vivo)
BMD – benchmark dose
LTL – Less-Than-Lifetime (léčba ≤ 10 let)
Cmax – max. koncentrace nečistoty (ppm)
ppm – parts per million

Analytika a výsledky mimo specifikaci

MS – hmotnostní spektrometrie
LC / GC – kapalinová / plynová chromatografie
ESI / APCI – elektrosprej / chemická ionizace za atm. tlaku
ISTD – vnitřní standard
LoQ (QL) – mez kvantifikace
LoD (DL) – mez detekce
S/N – poměr signálu k šumu
SST – test způsobilosti systému
RSD – relativní směrodatná odchylka
R, R^2 – korelační koeficient / determinace
DMF – dimethylformamid
ATP – cílový analytický profil
OOX – OOS + OOT + OOE
OOS – výsledek mimo specifikaci
OOT – výsledek mimo trend
OOE – mimo očekávanou variabilitu metody
REINJ – opakovaný nástřik
REEX – nová příprava / extrakce
REP – repetice (opakování zkoušky)

QUINTA ANALYTICA
a CONOCO company