

VALIDACIÓN METODOS DE ENSAYO



Instituto de
Salud Pública
Ministerio de Salud

Gobierno de Chile

Q.F. Marco Carmona Baez
Sección Fisicoquimico

2014

Decreto Supremo MINSAL N° 03 del año 2010:

- **Título II del Registro Sanitario de las Especialidades Farmacéuticas y otros productos farmacéuticos:**
- **Art. 32° y 40° Párrafo segundo: De los requisitos del Registro Sanitario,**
- **Título VI Laboratorios Farmacéuticos:**
- **Art. 145° Párrafo quinto: los procedimientos y registros;**
- **Art. 155° Párrafo sexto: del personal y las responsabilidades;**
- **Art. 187° Párrafo cuarto: de la exención de control de calidad y del control de serie**
- **Norma Técnica N° 131, nominada “Norma que define los criterios destinados a establecer la equivalencia terapéutica en productos farmacéuticos en Chile (EQT)” – Decreto Exento MINSAL N° 27 de 2012.**
- **Norma Técnica N° 127 de Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) – Decreto Exento MINSAL N° 28 de 2012.**
- **Norma Técnica N° 139 de Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL) – Decreto Exento MINSAL N° 543 de 2013.**

Definiciones

Método Ensayo (ME)

“Documento que explica detalladamente el conjunto de operaciones necesarias para efectuar un análisis determinado.”

ME Normalizado (Farmacopéico y/o Compendiado)

“ME publicados por organismos de normalización u organizaciones internacionales reconocidas en la normativa. Se considera un ME robusto.”

ME Normalizado – Modificado

“ME que ha sido adaptado por el laboratorio a partir de un método normalizado.”

ME No Normalizado

“ME que no se encuentra en normas u otras colecciones de métodos, correspondería a un nuevo método desarrollado por el propio laboratorio o adaptado de la bibliografía.”

Definiciones

Transferencia de Método de Ensayo

“Proceso documentado que califica a un laboratorio (unidad receptora) para emplear un método de ensayo que se origina en otro laboratorio (unidad que transfiere).”

Capítulo General <1224>

Verificación Métodos de ensayos

“ Es la evaluación que sirve para determinar si el procedimiento puede ser utilizado para su propósito previsto, en las condiciones de uso reales para un fármaco específico y/o matriz de un producto farmacéutico determinado.”

Capítulo General <1226>

Validación de un método de ensayo

“La validación de un método de ensayo es el proceso por el cual se establece, mediante estudios de laboratorio, que las características de desempeño del método cumplen con los requisitos para las aplicaciones analíticas indicadas.”

Capítulo General <1225>

Validación

- Calificación
- Mantenimiento/Calibración
- Verificación
- Validación ME
- Test Suitability
- Estándar control/ Durante el ensayo

Etapas para el Desarrollo de un método analítico

Investigación bibliográfica



Definir las condiciones de trabajo

Reactivos, estándares de referencia, equipos, personal, muestreo



Desarrollar el método

Encontrar las condiciones analíticas óptimas

Un método bien desarrollado se valida rápidamente



Estandarizar el método

Hacerlo práctico (considerar tiempo y recursos) e idóneo (preciso, exacto)



Validar / Verificar / Transferir

Demostrar que el método es confiable y reproducible en la entrega de los resultados



Transferencia de Procedimientos Analíticos

USP 37, capítulo general <1224> Transferencia de procedimientos analíticos.

–Se aplica a la transferencia de un procedimiento no oficial de un laboratorio a otro.

–Antes de implementar una transferencia, es necesario discutir, convenir y documentar un protocolo. Dicho documento debe incluir:

- Objetivo
- Alcance
- Responsabilidades de la unidad que transfiere y la unidad que Recepciona (capacitación, auditoria, transferencia información, etc.)
- Materiales e instrumentos.
- Procedimiento analítico.
- Diseño experimental y
- Criterios de aceptación para todas las pruebas y/o métodos incluidos en la transferencia.

Transferencia de Procedimientos Analíticos

– Dos tipos de transferencia de procedimientos analíticos:

- Análisis comparativo: Se transfiere un método previamente validado por la unidad que transfiere, se realiza el Análisis de muestras del mismo lote o muestras preparadas especialmente para la prueba.
- Co-validación entre laboratorios: La validación puede ser completa o parcial.

– Para la elección del tipo de transferencia debe realizarse en base a un análisis de riesgo.

– Análisis estadístico de datos:

- Recuperación de impurezas en producto con un cantidad agregada intencionalmente.
- Test comparación de media.
- Intervalos pre establecidos.
- Desviación estándar relativo.
- Evaluación perfiles de disolución (f2)

Transferencia de Procedimientos Analíticos



–Exención de la Transferencia:

- Composición del producto nuevo y/o la concentración del P.A. es comparable o similar con un producto existente
- El procedimiento analítico esta descrito en la USP.
- Procedimiento analítico es el mismo o similar.
- Personal a cargo del desarrollo, validación o análisis de rutina del producto en la unidad que transfiere se traslada a la unidad receptora.

Toda debe quedar registrado en Protocolo transferencia e Informe final.

Verificación de Procedimientos Farmacopeicos

- Los métodos publicados en la USP-NF se han validado y cumplen con los requisitos reglamentarios de las Buenas Prácticas de Fabricación vigentes....
- Los métodos validados pueden utilizarse para analizar una nueva formulación (por ej. un nuevo producto, forma de dosificación o producto intermedio del proceso) **únicamente después de verificar que la nueva formulación no interfiere con la exactitud, linealidad ni precisión del método.** No se puede suponer que un método validado puede medir correctamente el ingrediente activo de una formulación que es diferente a la utilizada para establecer la validez original del método.

Verificación de Procedimientos Farmacopeicos



– **Verificación: Desafiamos el entorno analítico utilizando un método bien caracterizado**

- Analista
- Instrumento
- Reactivos
- Matriz

– **Provee información general a los laboratorios acerca de como verificar procedimientos analíticos que se llevan a cabo por primera vez.**

Verificación de Procedimientos Farmacopeicos



- La verificación consiste en la evaluación de las características de desempeño analítico seleccionadas, como las del capítulo general <1225>.
- No se aplica en forma retroactiva.
- Se aplica a fármacos, productos terminados y excipientes.
- Se aplica a titulaciones volumétricas, procedimientos cromatográficos, espectroscópicos, etc.
- Pruebas tales como *Determinación de agua*, *Metales pesados* o *Pérdida por secado* en general no requieren verificación

APTITUD DEL SISTEMA

- Para determinar la eficacia del sistema operativo final se lo debe someter a una prueba de aptitud
- Las pruebas de aptitud son una parte integral de los métodos cromatográficos HPLC/ GC
- Se emplean para verificar que la sensibilidad de detección, la resolución y la reproducibilidad del sistema son adecuados para el análisis que se va a realizar
- Las pruebas de aptitud se basan en el concepto de que el equipo, el sistema electrónico, las operaciones analíticas y las muestras a analizar constituyen un **sistema integral que puede evaluarse como tal**

Definición del método a Validar
Cuali o Cuanti. – Analito – Matriz – Concentración Principio Activo

Tipo de Método

Es un Método Normalizado ?

Si
Normalizado

Normalizado Modificado

No
Nuevo o Desarrollado

Uso hace años Laboratorio

Modificación Significado?

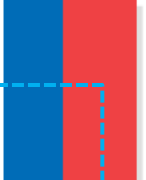
No
Verificación

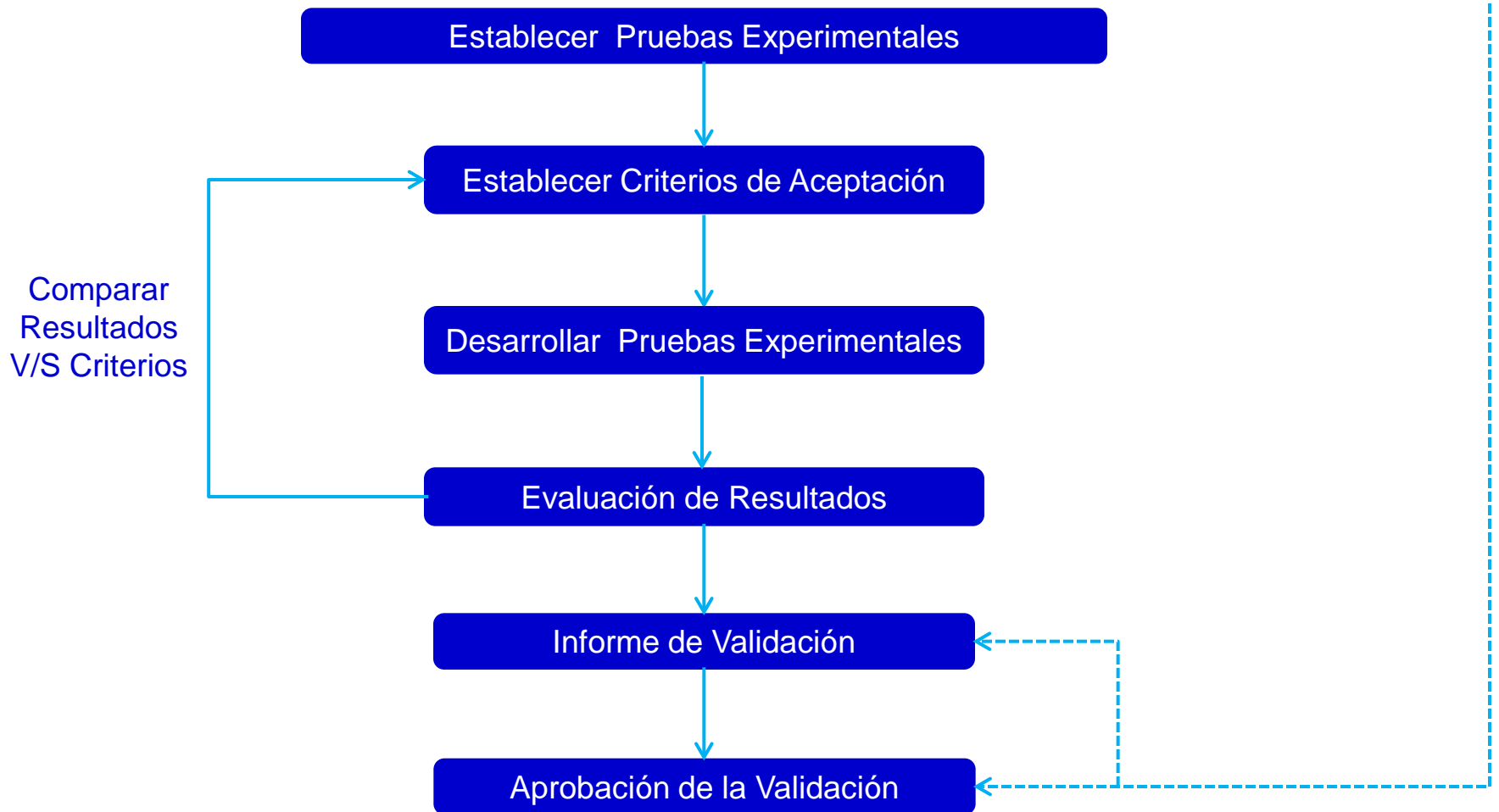
Si
Validación Prospectiva

Validación Retrospectiva

Establecer Parámetros a Evaluar

Continua





Parámetros a Validar

Parámetros Requeridos para la Validación

Parámetros a Evaluar	Categoría I	Categoría II		Categoría III	Categoría IV
		Cuantitativo	Limite		
Exactitud	Si	Si	*	*	No
Precisión	Si	Si	No	Si	No
Especificidad	Si	Si	Si	*	Si
Límite de Detección	No	No	Si	*	No
Límite de Cuantificación	No	Si	No	*	No
Linealidad	Si	Si	No	*	No
Rango	Si	Si	*	*	No
Robustez	Si	Si	Si	Si	Si

* Pueden requerirse dependiendo de la naturaleza del test.

- Valition of Compendial Methods <1225>

Parámetros a Validar

Parámetros Requeridos para la Validación

Tipo de procedimiento analítico	Identificación	Análisis de impurezas		Valoración
		Ensayos cuantitativos	Ensayos de límite	disolución (sólo medición) contenido/potencia
Exactitud	-	+	- ^b	+
Precisión:				
1.Repetibilidad	-	+	-	+
1. Precisión Intermedia ^a	-	+	-	+
Especificidad	+	+	+	+
Límite de detección	-	- ^b	+	-
Límite de cuantificación	-	+	-	-
Linealidad	-	+	-	+
Intervalo - Rango	-	+	- ^b	+

+ La característica debe ser evaluada normalmente.

- La característica no se evalúa normalmente;

^a La precisión intermedia no es necesaria en casos donde se ha realizado un estudio de reproducibilidad.

^b Puede necesitarse en algunos casos.

Especificidad



ICH Q2A y USP (United States Pharmacopeia):

- La capacidad de evaluar en forma inequívoca al analito en presencia de los componentes cuya presencia cabría esperar, tales como impurezas, productos de degradación y componentes de la matriz
- La falta de especificidad de un procedimiento analítico individual puede compensarse mediante otros procedimientos analíticos de apoyo

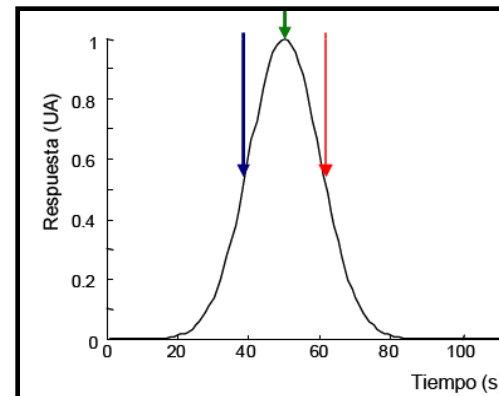
Especificidad

Evaluación:

- a.- Se realiza lectura de cada componente de la formulación de la forma farmacéutica a analiza de manera independiente.
- b.- Se realiza lectura del solvente en las misma condiciones de preparación de la muestra y del estándar.
- c.- Se realiza lectura de la mezcla de todos los componentes.

HPLC

- La resolución tiene que ser $R \geq 1.5$.
- Cada analito debe tener su tiempo retención característico.
- Evaluación del espectro UV.
- Evaluación de pureza de peak.



Linealidad

- Es esencialmente un proceso mediante el cual, la respuesta de un sistema de medida (señal analítica) puede expresarse en términos de una cualidad o cantidad de interés (concentración de analito).
- Descripción de los puntos que representan la curva

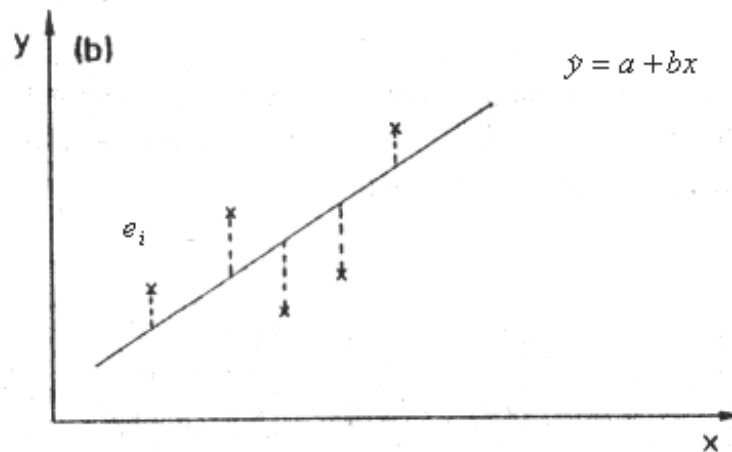
Linealidad

Función de Respuesta	Nombre	Técnica (Ej.)
$y = A + B x$	Ley de Beer	Espectroscopia de absorción
$y = A + B \log x$	Nertst	Electroquímica
$y = A x^B$	Scheibe-Lomakin	Espectroscopia de emisión
$y = A + B x + C x^2$	Wagennar y col.	Absorción atómica
$y = A + B [1 - \exp(-C x)]$	Andrews y col.	Absorción atómica
$y = \frac{A - D}{1 + \left(\frac{x}{C}\right)^B} + D$	Rodbard	Radioinmunoensayo

Linealidad

Mínimos Cuadrados: minimiza la suma al cuadrado de los residuales

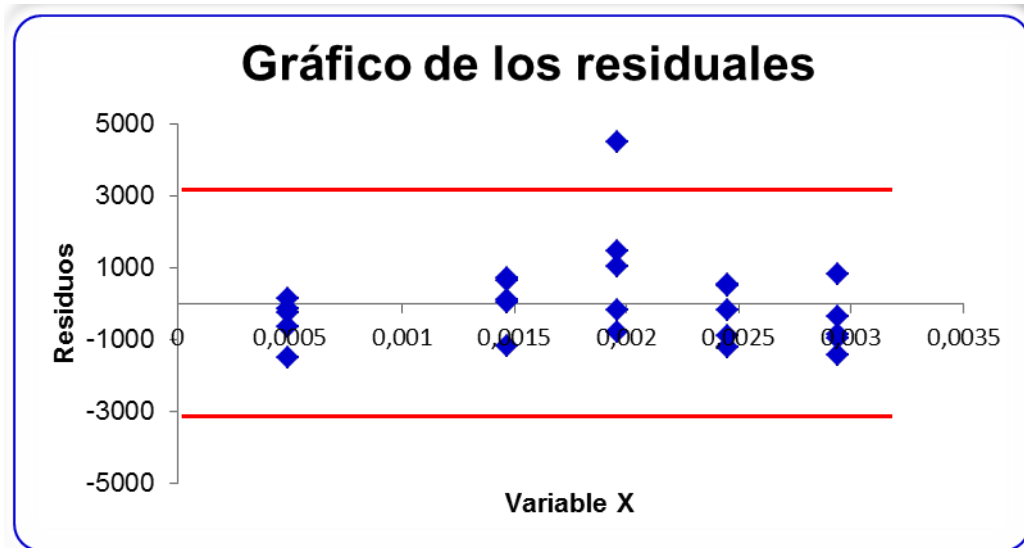
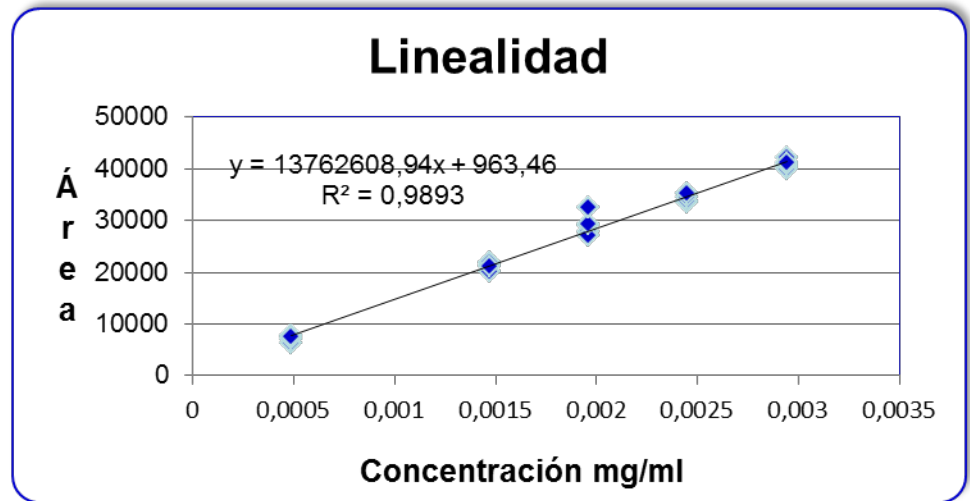
- Variable x este exenta de error.
- La varianza permanece constante en todo el intervalo de concentraciones.
- Los valores de y presenten una distribución normal



Linealidad

$$y = 13762608,94x + 963,46$$

x	y	y'	y-y'
0,00049	7852	7707,138381	144,861619
0,00049	6215	7707,138381	-1492,13838
0,00049	7464	7707,138381	-243,138381
0,00049	7069	7707,138381	-638,138381
0,00049	7556	7707,138381	-151,138381
0,00147	20026	21194,49514	-1168,49514
0,00147	21297	21194,49514	102,504858
0,00147	21896	21194,49514	701,504858
0,00147	21845	21194,49514	650,504858
0,00147	21237	21194,49514	42,5048582
0,00196	28989	27938,17352	1050,82648
0,00196	27774	27938,17352	-164,173522
0,00196	27162	27938,17352	-776,173522
0,00196	29409	27938,17352	1470,82648
0,00196	32435	27938,17352	4496,82648
0,00245	35190	34681,8519	508,148097
0,00245	33466	34681,8519	-1215,8519
0,00245	33778	34681,8519	-903,851903
0,00245	34494	34681,8519	-187,851903
0,00245	35238	34681,8519	556,148097
0,00294	42244	41425,53028	818,469716
0,00294	40448	41425,53028	-977,530284
0,00294	40010	41425,53028	-1415,53028
0,00294	40586	41425,53028	-839,530284
0,00294	41056	41425,53028	-369,530284



Linealidad

- Se realiza en un mínimo de 5 puntos
- La linealidad debe ser evaluada a través de la inspección visual de un gráfico de la concentración o contenido del analito versus la señal entregada por el equipo.

Criterios de aceptación

a.- Principio Activo:

Rango de estudio establecido por tipo de ensayo

El coeficiente de determinación $r^2 \geq 0.99$; se aplica estadístico “ t “;

El $CV \leq 2.0 \%$ o lo indicado monografía individual y el $CV_{FR} \leq 5.0 \%$.

Intervalo de confianza del intercepto incluye el cero.

Gráfica de los residuos

b.- Impureza:

La curva se realiza en un rango mínimo de $\pm 20 \%$ de la especificación;

El coeficiente de determinación $r^2 \geq 0.95$; se aplica estadístico “ t “;

El $CV \leq$ indicado monografía individual y el $CV_{FR} \leq 5.0 \%$.

Intervalo de confianza del intercepto incluye el cero.

Gráfica de los residuos

Precisión ICH-USP



- Se denomina precisión a la capacidad de un instrumento de dar el mismo resultado en mediciones diferentes realizadas en las mismas condiciones.
- Repetibilidad: coincidencia dentro de un periodo *corto* para el *mismo analista con la misma instrumentación*
- Precisión intermedia: coincidencia en los resultados del *mismo laboratorio, pero en días distintos con analistas y equipo diferentes* (según corresponda)
- Reproducibilidad: coincidencia en los resultados entre laboratorios (como en un estudio colaborativo)

Precisión

a.- Tanto para la repetibilidad como para la precisión intermedia;

- A menos que se especifique algo diferente en la monografía individual, el coeficiente de variación (CV) del métodos analíticos debe ser menor o igual al 2 %.

- Para determinar el coeficiente de variación aceptable para el análisis de impurezas, elementos trazas, productos de degradación, etc. esta dado por la ecuación de Hortwitz, la cual queda expresada en la siguiente ecuación:

$$CV (\%) = 2^{(1 - 0,5 \log C)}$$

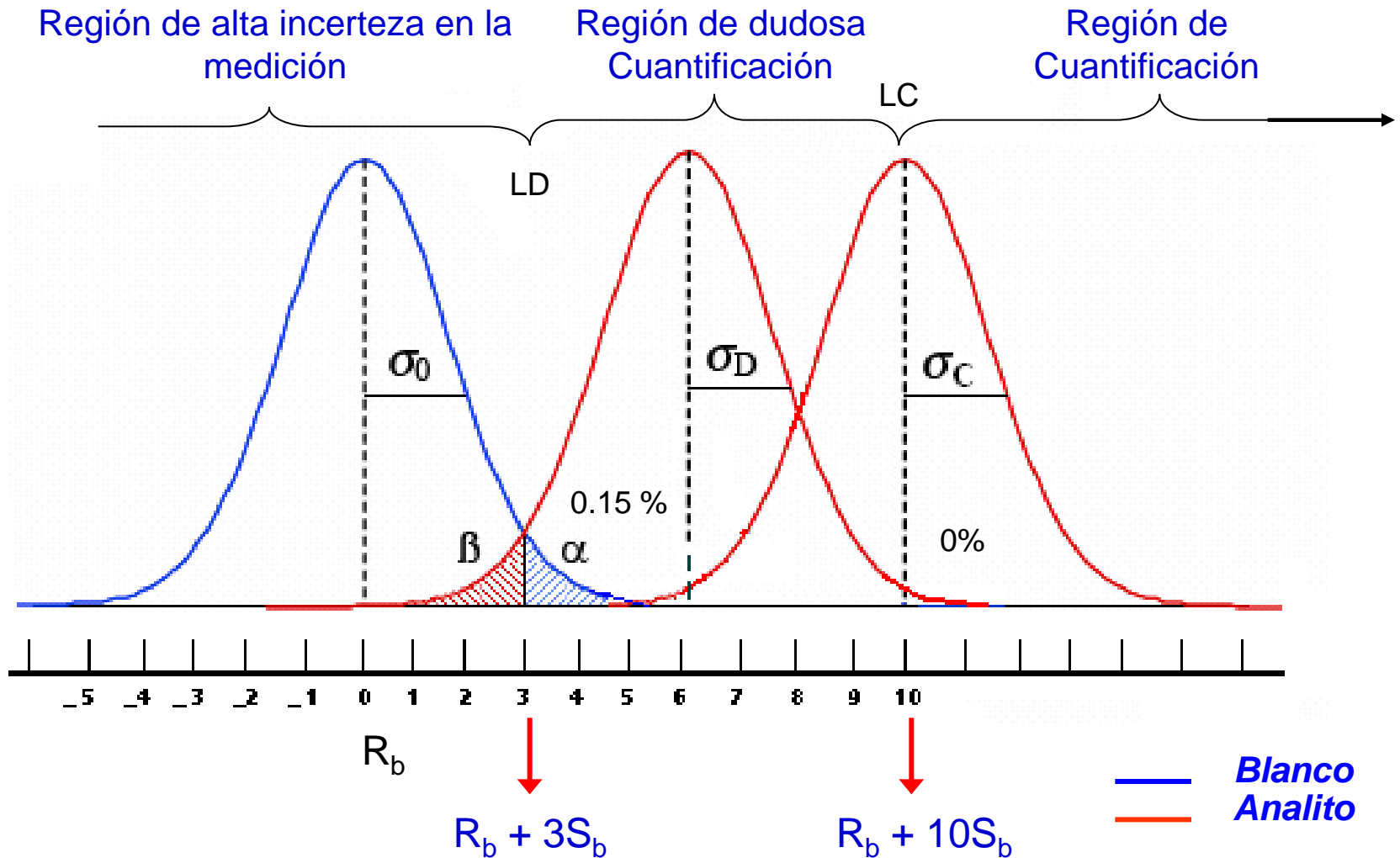
Donde: C es la concentración de la muestra expresada en concentración (ej. mg/ml, ppm, M, N etc.).

Exactitud



- Se denomina exactitud a la capacidad de un instrumento de acercarse al valor de la magnitud real.
- Formas de determinar la exactitud
 - Mezcla con excipientes (placebo con una cantidad agregada conocida de Estándar)
 - Método adición de estándar (muestra con cantidad agregada conocida)
 - Se deduce a partir de **los datos de especificidad y linealidad**.
 - Comparación con un método reconocido como exacto (método de referencia)

Limite de Detección y Cuantificación



Limite de Detección y Cuantificación

Son posibles diversos enfoques para la determinación del límite de detección y el límite de cuantificación

a.- Ruido:

$$\text{Limite Detección} = 3 \times R$$

$$\text{Limite Cuantificación} = 10 \times R$$

b.- Se resta el blanco:

$$\text{Limite Detección} = \frac{3.3 DS_b}{m} \quad \text{Limite Cuantificación} = \frac{10 DS_b}{m}$$

c.- No se lee el blanco:

$$\text{Limite Detección} = \frac{Y_b + 3.3 DS_b}{m}$$

$$\text{Limite Cuantificación} = \frac{Y_b + 10 DS_b}{m}$$

Validación – Verificación Materia Prima

- **Identidad**
IR, UV
HPLC
- **Ensayo de pureza**
Perdida por secado,
Residuo por ignición
Metales pesados
pH
Sust. Relacionadas
- **Ensayo**
Titulación
HPLC



Parámetro	Validación	Verificación
Exactitud	No	No
Precisión	No	No
Especificidad	Si	Tal vez
LD	No	No
LC	No	No
Linealidad	No	No
Rango	No	No

Validación – Verificación Materia Prima

- **Identidad**
IR, UV
HPLC
- **Ensayo de pureza**
Perdida por secado,
Residuo por ignición
Metales pesados
pH
Sust. Relacionadas
- **Ensayo**
Titulación
HPLC



Parámetro	Validación	Verificación
Exactitud	No	No
Precisión	No	No
Especificidad	Si	No
LD	Si	No
LC	No	No
Linealidad	No	No
Rango	No	No

Validación – Verificación Materia Prima

- **Identidad**
IR, UV
HPLC
- **Ensayo de pureza**
Perdida por secado,
Residuo por ignición
Metales pesados
pH
Sust. Relacionadas
- **Ensayo**
Titulación
HPLC



Parámetro	Validación	Verificación
Exactitud	Si	No
Precisión	Si	Tal vez
Especificidad	Si	Si
LD	No	No
LC	Si	Si
Linealidad	Si	No
Rango	Si	No

Validación – Verificación Materia Prima

- **Identidad**
IR, UV
HPLC
- **Ensayo de pureza**
Perdida por secado,
Residuo por ignición
Metales pesados
pH
Sust. Relacionadas
- **Ensayo**
Titulación
HPLC



Parámetro	Validación	Verificación
Exactitud	Si	No
Precisión	Si	Tal vez
Especificidad	Si	Tal vez
LD	No	No
LC	No	No
Linealidad	Si	No
Rango	Si	No

Validación – Verificación

Producto Terminado

- **Identidad**
HPLC
- **Ensayo Especif.**
Partículas en iny.
Uniformidad
Disolución
- **Impureza**
Sust. relacionada
Solv. residuales
- **Ensayo**



Parámetro	Validación	Verificación
Exactitud	No	No
Precisión	No	No
Especificidad	Si	Si
LD	No	No
LC	No	No
Linealidad	No	No
Rango	No	No

Validación – Verificación

Producto Terminado

- **Identidad**
HPLC
- **Ensayo Especif.**
Partículas en iny.
Uniformidad
Disolución
- **Impureza**
Sust. relacionada
Solv. residuales
- **Ensayo**



Parámetro	Validación	Verificación
Exactitud	Tal vez	Tal vez
Precisión	Si	Si
Especificidad	Tal vez	Si
LD	Tal vez	No
LC	Tal vez	Tal vez
Linealidad	Tal vez	No
Rango	Tal vez	No

Validación – Verificación

Producto Terminado

- **Identidad**
HPLC
- **Ensayo Especif.**
Partículas en iny.
Uniformidad
Disolución
- **Impureza**
Sust. relacionada
Solv. residuales
- **Ensayo**



Parámetro	Validación	Verificación
Exactitud	Si	Tal vez
Precisión	Si	Si
Especificidad	Si	Si
LD	No	No
LC	Si	Si
Linealidad	Si	No
Rango	Si	No

Validación – Verificación

Producto Terminado

- **Identidad**
HPLC
- **Ensayo Especif.**
Partículas en iny.
Uniformidad
Disolución
- **Impureza**
Sust. relacionada
Solv. residuales
- **Ensayo**



Parámetro	Validación	Verificación
Exactitud	Si	Tal vez
Precisión	Si	Si
Especificidad	Si	Si
LD	No	No
LC	No	No
Linealidad	Si	No
Rango	Si	No

Validación – Uniformidad de Dosis

Parámetro		Criterio
Exactitud	Promedio recuperación	95 – 105 %
Precisión	CV % Recuperación Ind.	$\leq 2,5$ %
	DS residual de la linealidad (relacionado con el contenido del 100% del P.A.)	$\leq 2,5$ %
Especificidad	Comparación Visual	No existe interferencia con el P.A.
Linealidad	DS residual de la linealidad (relacionado con el contenido del 100% del P.A.)	$\leq 2,5$ %
	Intercepto en “y” (relacionado con el contenido del 100% del P.A.)	$\leq 2,5$ %
	Coefficiente de Correlación r	$\geq 0,997$
Estabilidad de la solución	Cambio en respuesta en 24 – 36 h	≤ 2 %

Validación – Productos de Degradación

Parámetro		Criterio
Exactitud	Promedio recuperación	80 – 120 %
Precisión	CV % Recuperación Ind.	$\leq 15 \%$
	DS residual de la linealidad (relacionado con el contenido del 100% del P.A.)	$\leq 15 \%$
Especificidad	Comparación Visual	No existe interferencia con el P.A.
Linealidad	DS residual de la linealidad (relacionado con el contenido del 100% del P.A.)	$\leq 15 \%$
	Intercepto en “y” (relacionado con el contenido del 100% del P.A.)	$\leq 25 \%$
	Coefficiente de Correlación r	$\geq 0,98$
LC	$10 \cdot DS/m$	\leq nivel reportado
Estabilidad de la solución	Cambio en respuesta en 24 – 36 h	$\leq 2 \%$

Validación – Productos de Degradación Toxicas



Parámetro		Criterio
Exactitud	Promedio recuperación	95 – 105 %
Especificidad	Comparación Visual	No existe interferencia con el P.A.
Linealidad	DS residual de la linealidad (relacionado con el contenido del 100% del P.A.)	$\leq 4 \%$
	Intercepto en “y” (relacionado con el contenido del 100% del P.A.)	$\leq 25 \%$
Sensibilidad	Visual (relacionado con el contenido del 100% del P.A.)	$\leq 0,5 \%$
Estabilidad de la solución	Cambio en respuesta en 24 – 36 h	$\leq 2 \%$



Validación – Disolución Q 70 %

Parámetro		Criterio
Exactitud	Promedio recuperación	90 – 110 %
Precisión	CV % Recuperación Ind.	$\leq 4 \%$
	DS residual de la linealidad (relacionado con el contenido del 100% del P.A.)	$\leq 4 \%$
Especificidad	Comparación Visual	No existe interferencia con el P.A. $\leq 2,5 \%$
Linealidad	DS residual de la linealidad (relacionado con el contenido del 100% del P.A.)	$\leq 4 \%$
	Intercepto en “y” (relacionado con el contenido del 100% del P.A.)	$\leq 10 \%$
	Coeficiente de Correlación r	$\geq 0,985$
Estabilidad de la solución	Cambio en respuesta en 24 – 36 h	$\leq 3 \%$
Filtro	Diferencia en respuesta	$\leq 4 \%$

Validación – Disolución 10 %

Parámetro		Criterio
Exactitud	Promedio recuperación	90 – 110 %
Precisión	CV % Recuperación Ind.	$\leq 4 \%$
	DS residual de la linealidad (relacionado con el contenido del 100% del P.A.)	$\leq 4 \%$
Especificidad	Comparación Visual	No existe interferencia con el P.A. $\leq 2,5 \%$
Linealidad	DS residual de la linealidad (relacionado con el contenido del 100% del P.A.)	$\leq 4 \%$
	Intercepto en “y” (relacionado con el contenido del 100% del P.A.)	$\leq 10 \%$
	Coefficiente de Correlación r	$\geq 0,985$
LC	$10 \cdot DS/m$	$\leq 5 \%$
Estabilidad de la solución	Cambio en respuesta en 24 – 36 h	$\leq 3 \%$
Filtro	Diferencia en respuesta	$\leq 4 \%$

CRITERIOS DE REVALIDACIÓN



Los parámetros a realizar en la revalidación dependen de los cambios o las modificaciones que se realizan o se han realizado al método de ensayo, pudiendo ser todos o una parte de estos los que deben quedar establecido en plan de validación.

- Después de 5 años el método tiene que revalidarse
- Cambio de matriz
- Cambio en el Equipo/Instrumento/Analista
- Transferencia del método
- Modificaciones de parámetros analíticos



GRACIAS

