

Validación de métodos analíticos

Temas

- Definiciones de Términos
Validación, Re-validación, Verificación, transferencia de Métodos
- Cuando validar una metodología
- Cuando verificar una metodología
- Qué cambios se permiten sin revalidar
- Qué situaciones / cambios conllevan a una revalidación
- Qué parámetros deben ser verificados por los métodos de la farmacopea o métodos que fueron validados por otra institución (métodos de los fabricantes)

Conceptos



USP Es el proceso por el cual se establece, por medio de estudios de laboratorio, que las características de desempeño de un procedimiento cumplen con los requisitos para la aplicación analítica prevista.

ICH El objetivo de la validación de un procedimiento analítico es demostrar que es apropiado para el uso previsto.

GENERACION DE EVIDENCIA DOCUMENTADA



Conceptos

Técnica: Principio físico o químico que puede emplearse para analizar una muestra.

Método: modificación de la técnica para analizar una muestra a fin de hallar un analito dado en una matriz específica.

Procedimiento: Instrucciones escritas que señalan la forma de analizar una muestra.

Protocolo: conjunto de instrucciones escritas especificadas por un organismo para ejecutar la validación.



Antecedentes



USP Capítulo General <1225>

- Capítulo general <1225> Validación de Procedimientos Farmacopeicos – Propuesto inicialmente en 1986 – Adoptado en USP XXI.

1989 – Revisiones en USP 23, 29 y 32.....

ICH Q2A/B

- ICH Q2A: Text in Validation of Analytical Procedures – UE: Adoptado por CPMP, publicado como CPMP/ICH/381/95.
- FDA: Federal Register, volumen 60, N°. 40, 1° de marzo, 1995, páginas 11260-11262.
- ICH Q2B: Methodology – UE: Adoptado por CPMP, publicado como CPMP/ICH/281/95 – FDA: Federal Register, volumen 62, N°. 96, 19 de mayo, 1997, páginas 27463-27467.
- ICH Q2(R1) – Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Nov. 20.

AOAC-VIC

- Agencias sanitarias de medicamentos. Pej. Española, Chile ,ANVISA, COFEPRIS.



GOBIERNO
DE COLOMBIA



MINSALUD

invima
Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos

Parámetros Comunes

- ✓ Especificidad

Con análisis cromatográficos este es un problema menor

- ✓ Precisión - Repetibilidad

- ✓ Exactitud - Que tan real es el resultado

- ✓ Robustez - La capacidad del método al enfrentarse a cambios menores en el procedimiento y los reactivos.

- ✓ Linealidad - La capacidad del método para dar resultados precisos en todo el rango de los resultados esperados

- Límite de Detección

- Límite de Cuantificación



Aspectos en Común



En los diferentes documentos o guías es común encontrar:

- Conceptos de cada uno de los parámetros a evaluar.
- Los parámetros a evaluar dependiendo de la categoría de la metodología en función a su propósito analítico o uso.
- Forma de evaluar el parámetro
- Criterios de evaluación- tratamiento estadístico
- Criterios de aceptación.

Debido a que estos criterios se encuentran armonizados internacionalmente por la comunidad científica

Legislación Colombiana

El Informe 44 (Anexo 1) de la OMS indica que las metodologías analíticas deben estar validadas pero no indican el cómo.

El decreto 677 del 1995 Las farmacopeas oficialmente aceptadas en Colombia son las siguientes

- Estados Unidos de Norteamérica (USP).
- Británica (BP), Codex Francés
- Alemana (DAB)
- Europea e Internacional o la que en su momento rija para la Unión Europea.

Legislación Colombiana

Capítulo general <1223> Validación de Métodos microbiológicos alternativos.

Capítulo general <1224> Transferencia de procedimientos analíticos.

Capítulo general <1225> Validación de Procedimientos Farmacopeicos

Capítulo general <1226> Verificación de procedimientos farmacopeicos

Capítulo general <1227> Validación de recuperación microbiana en artículos farmacopeicos

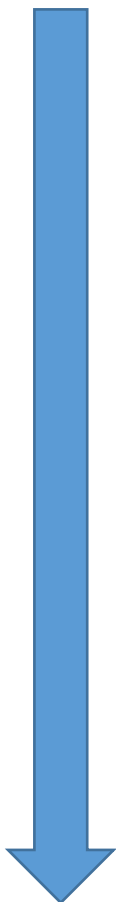


Validación

Cada vez que un laboratorio desarrolla un procedimiento analítico, debe asegurar que los métodos utilizados se ajusten para el propósito esperado y esté adecuadamente validado. Los métodos nuevos, que requieren validación pueden incluir alguna metodología desarrollada con base en "la literatura científica", publicada en revistas y métodos propuestos por los fabricantes de instrumentos y columnas.

Posterior al desarrollo del método, es esencial que el laboratorio realice una validación completa y adecuada.

Pre-Requisitos

- 
- ▣ REVISION DE LITERATURA
 - ▣ REVISO MONOGRAFIAS DE FARMACOPEAS.
 - ▣ ARTICULOS CIENTIFICOS
 - ▣ REVISTAS DE CROMATOGRAFIA
 - ▣ *Journal Cromatography B, 877 (2009) , en Journal of Cromatography, Elsevier entre otros.*
 - ▣ REVISIÓN Y ANÁLISIS DE LA MOLÉCULA, (estabilidad, estructura química, propiedades físicas, enantiomeros, productos de degradación conocidos o identificados)





Pre-Requisitos

▣ ESTANDARIZACIÓN DEL MÉTODO

- ▣ Realización de los primeros ensayos, para determinar si el método es adecuado y reproducible.
- ▣ Optimización de Las condiciones analíticas.

Pej. Cambio de flujo.

Mejorar las condiciones de la señal.

Mejorar las condiciones del método de extracción.

Cambiar la fase móvil.

Aumentar temperatura.

Disminución volúmenes de solventes

La señal esta co-eluyendo

Optimización de la adecuabilidad del sistema. (asimetría, coeficiente de variación, factor de capacidad, numero de platos teóricos, resolución)



GOBIERNO
DE COLOMBIA



MINSALUD

invima
Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos

Pre-Requisitos

- ▣ **METODOS DOCUMENTADOS.**
- ▣ **INSTRUMENTOS CALIFICADOS Y CALIBRADOS.**
- ▣ **ESTANDARES DE REFERENCIA VIGENTES Y DISPONIBLE.**
- ▣ **ANALISTAS CALIFICADOS EN LA TECNICA A EVALUAR.**
- ▣ **DISPONIBILIDAD DE MUESTRA. CARACTERIZADA, SUFICIENTE Y HOMOGENEA**



Pre-Requisitos



- Debe realizarse de acuerdo a un protocolo de validación, que incluye las características de desempeño analítico a ser verificadas por varios procedimientos analíticos.
- En la fase de desarrollo de un procedimiento analítico, la robustez, por ejemplo, la capacidad del procedimiento para proporcionar resultados de exactitud y precisión aceptable, bajo una variedad de condiciones debe también ser considerada.

Pre-Requisitos

PROTOCOLO APROBADO

TABLA DE CONTENIDO

1. NOMBRE
2. FECHA DE EMISION DEL PROTOCOLO
3. OBJETIVO
4. REFERENCIAS
5. RESPONSABILIDADES
6. ALCANCE
7. INFORMACIÓN VALIDACIÓN
 - 7.1. PERSONAL A CARGO DE LA VALIDACIÓN
 - 7.2. ESPECIFICACIONES DEL PRODUCTO
 - 7.3. EQUIPOS
 - 7.4. MATERIALES
 - 7.4.1. ESTANDÁR(ES)
 - 7.4.2. REACTIVOS
 - 7.4.3. MATERIAL VOLUMETRICO
 - 7.5. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO, DIAGRAMA DE FLUJO DEL PROCESO ANALÍTICO Y/O PARÁMETROS DE APTITUD DEL SISTEMA
 - 7.6. PARÁMETROS DE EVALUACIÓN
 - 7.7. DISEÑO EXPERIMENTAL
8. EJECUCIÓN



GOBIERNO
DE COLOMBIA



MINSALUD

invima
Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos

Validación-Parámetros

PARAMETRO	Valoración Fármaco	Valoración Impurezas	Pruebas Límite	Pruebas de Desempeño	Pruebas de Identificación
Exactitud	X	X			
Precisión	X	X		X	
Especificidad	X	X	X		X
Limite de Detección			X		
Limite de Cuantificación		X			
Linealidad	X	X			
Intervalo	X	X			



Validación-Parámetros

Parámetro de desempeño	Tipo de prueba					
	Espectrofotométrica	Cromatográfica	Potenciométrica	Volumétrica	Gravimétrica	Física
Intervalo lineal y de trabajo	SI	SI	SI	SI	SI	NO
Límite de detección	SI ^a	SI ^a	NO	NO	NO	SI ^b
Límite de cuantificación	SI ^a	SI ^a	SI ^a	SI ^a	SI ^a	NO
Recuperación	SI	SI	NO	SI	SI	NO
Sesgo	SI	SI	SI	SI	SI	NO
Repetibilidad	SI	SI	SI	SI	SI	SI ^c
Reproducibilidad	SI	SI	SI	SI	SI	SI ^c
Incertidumbre	SI	SI	SI	SI	SI	SI ^c
Sensibilidad	SI ^d	SI ^d	SI ^{d,e}	SI ^e	SI ^d	NO
Selectividad	SI ^d	SI ^d	SI ^{d,e}	SI	SI	SI ^b
Robustez	SI ^d	SI ^d	SI ^d	SI ^d	SI ^d	SI ^d

^a Solo para análisis a nivel de trazas (ppm, ppb, ppt)

^b Solo métodos cualitativos.

^c Solo métodos cuantitativos.

^d Solo aplica para métodos no normalizados.

^e Solo para el análisis de aniones y cationes por ión selectivo

Nota: Solo para métodos gravimétricos y volumétricos la selectividad se sustenta con los resultados de linealidad, recuperación, repetibilidad y reproducibilidad, si estos cumplen con los criterios de aceptación establecidos



Especificidad

Es la capacidad del método de medir específicamente el analito en presencia de los componentes presentes en la matriz analítica, inequívoca de impurezas, productos de degradación y/o excipientes o componentes de la matriz.

Si se dispone de las impurezas: utilizar placebos, impurezas y placebos enriquecidos.

Si no se dispone de impurezas o productos de degradación.

Efectuar una degradación artificial, bajo condiciones drásticas (ácidos: 0,1 N y bases, oxidación, termólisis y fotólisis, etc.).

Comparar los resultados con otro método analítico bien caracterizado.



Especificidad

Requerida para la validación de – Pruebas de identificación (categoría IV) – Determinación de impurezas (categoría II) – Valoración (categoría I).

Especificidad

- En el análisis farmacopeico, la falta de especificidad de un método puede ser complementada con otro de manera de obtener el nivel total de selectividad deseado.
- IUPAC, AOAC prefieren el término “selectividad” , reservando el término “especificidad” para los procedimientos totalmente selectivos



Especificidad

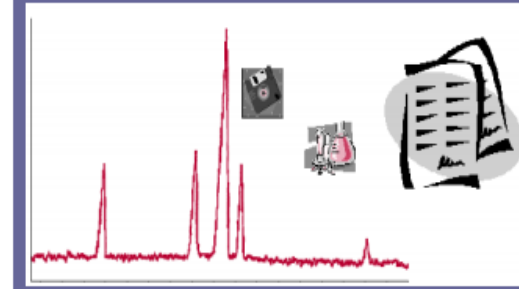
Pruebas de Identificación en las monografías de USP •
Identificación espectroscópica . Capítulo <197>

– Comparación de espectro IR con estándar es la evidencia más concluyente de identidad UV menos específica

Especificidad

– UV menos específica – Polimorfismo: “Si aparece una diferencia en los espectros IR del analito y del estándar, disolver porciones iguales de la muestra y del estándar en volúmenes iguales de un disolvente apropiado, evaporar la solución hasta sequedad bajo condiciones idénticas y repetir la prueba con los residuos”.

• Correspondencia de tiempos de retención o Rf



Especificidad

Degradaciones forzadas

- Hidrolisis ácida: se realiza adicionando generalmente ácido Clorhídrico 1N o 0,1N y sometiendo la muestra a reflujo en baño de María por un tiempo adecuado (1 hora).

Hidrolisis básica: se realiza adicionando generalmente Hidróxido de Sodio 1N o 0,1N y sometiendo la muestra a reflujo en baño de María por un tiempo adecuado (1 hora).

Fotólisis: se realiza exponiendo la muestra en la concentración de análisis a u Luz UV, Fluorescente o luz natural.

Termólisis: Someter la muestra a altas temperaturas (20°C por debajo del punto de fusión)

Oxidación: Adición de peróxido de hidrogeno 3% a la muestra y sometimiento a reflujo

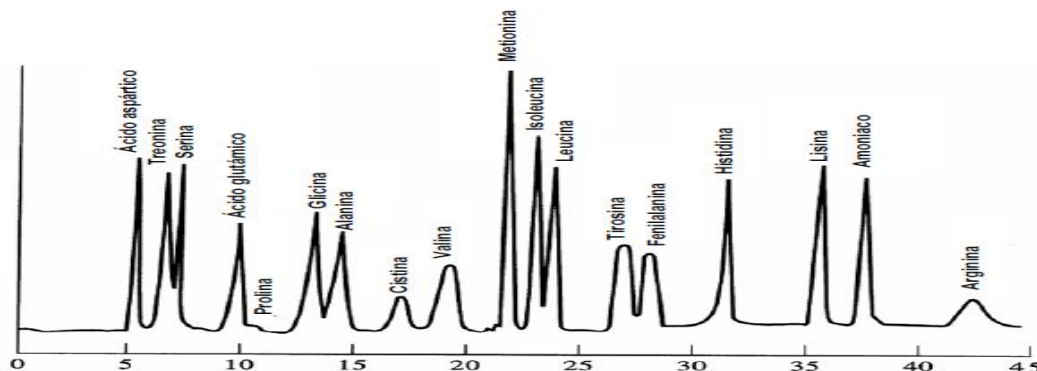
Especificidad

Criterio de Aceptación

El tiempo y las condiciones se deben seleccionar para garantizar una degradación entre el 15% y el 30%.

La respuesta del método debe ser debida al analito.

La respuesta de las impurezas, compuestos de degradación y/o excipientes, no debe interferir con la señal principal del analito de interés y se pueden anexar la pureza cromatografica en los resultados.



Precisión



Es el grado de concordancia entre los resultados de las muestras individuales cuando se aplica el procedimiento repetidamente a múltiples muestreos de una muestra homogénea

Expresa el grado de dispersión entre una serie de mediciones múltiples de una muestra homogénea bajo condiciones establecidas.

La precisión de un método comprende:

Precisión



Repetibilidad. Medida de la precisión del método cuando éste se realiza por el mismo analista, el mismo día, los mismos reactivos, el mismo instrumento.

Reproducibilidad Esta se mide cuando el ensayo se realiza en diferentes laboratorios por diferentes analistas, diferentes días, diferentes instrumentos.

Precisión Intermedia. También conocida como tolerancia o fortaleza, expresa la variación dentro de un laboratorio, por ejemplo en diferentes días, con diferentes analistas o con diferentes equipos.

Repetibilidad

La ICH recomiendan utilizar un mínimo de nueve determinaciones que cubran el intervalo especificado (es decir, tres concentraciones y tres determinaciones repetidas en cada concentración), o usando un mínimo de seis determinaciones al 100% de la concentración de prueba.

Estadístico de prueba: Coeficiente de variación

Parámetro	Absorbancia
Resultados de análisis	0,5837007
	0,5848420
	0,5843530
	0,5820943
	0,5817180
	0,5814257
	0,5818075
	0,5811123
	0,5805577
	0,5801427
Nº datos válidos	10
Promedio	0,5821754
Desviación estándar	0,0015976
Coeficiente de variación (%)	0,27



Repetibilidad

Criterio de Aceptación

Límite de valoración (%)	% RSD máxima
99,0 – 101,0	0,37
98,5 – 101,5	0,55
98,0 – 102,0	0,73
95,0 – 105,0	1,9
90,0 – 110,0	3,9
Impurezas	5 a 25

1 Pharmaeuropa, 11(4), 571-577

2 Pharm. Technol., 6(9), 120-137

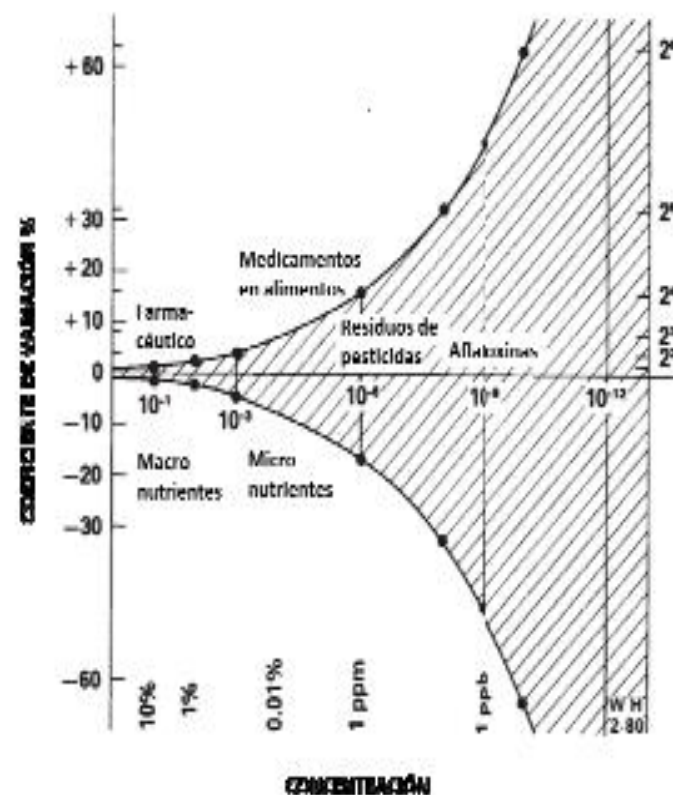


Figura 1. Trompeta de Horwitz⁶

Precisión del Método

Peso (mg)	Resultado	
	Absorbancia	% encontrado
49,12	0,5676939	99,53
49,07	0,5648144	99,14
49,25	0,5678453	99,30
49,22	0,5690663	99,57
48,89	0,5584285	98,41
49,49	0,5738296	99,84
N° datos válidos	6	
Promedio (%)	99,30	
Desviación estándar	0,50	
Coeficiente de variación (%)	0,50	

Para evaluar la precisión del método se analizan un mínimo de seis determinaciones que contengan una cantidad aproximada a 100% del Ingrediente Activo y de cada una se realizan dos lecturas en el equipo de medición.



Precisión Intermedia



Concordancia entre los resultados obtenidos:

- Muestreos provenientes de una muestra homogénea
- Analistas (2)
- Días (3)
- Instrumentos (2)
- En el mismo laboratorio
- ✓ Promedio, Desviación Estándar, Coeficiente de Variación, Anova, Coeficiente de Variación Global

Precisión Intermedia



DETERMINACIÓN DE LA PRECISIÓN INTERMEDIA

	ENSAYO	% ENCONTRADO		
		DIA 1	DIA 2	DIA 3
ANALISTA 1	1	100,5	99,8	101,2
	2	101,2	100,1	102,1
	3	100,2	100,9	102,6
PROMEDIO =		100,7	100,3	102,0
Desviacion estandar s =		0,54	0,56	0,71
CV% =		0,53	0,56	0,70

	ENSAYO	% ENCONTRADO		
		DIA 1	DIA 2	DIA 3
ANALISTA 2	1	99,3	101,1	101,2
	2	101,1	97,8	102,1
	3	101,8	97,9	102,6
PROMEDIO =		100,7	98,9	102,0
Desviacion estandar s =		1,29	1,87	0,71
CV% =		1,28	1,89	0,70

Promedio de %	
Encontrado Global =	100,76
Desviación Estándar	
Global =	1,40
%CV Global =	1,39
CONCEPTO % CV CUMPL	
Global =	E



GOBIERNO
DE COLOMBIA



MINSALUD

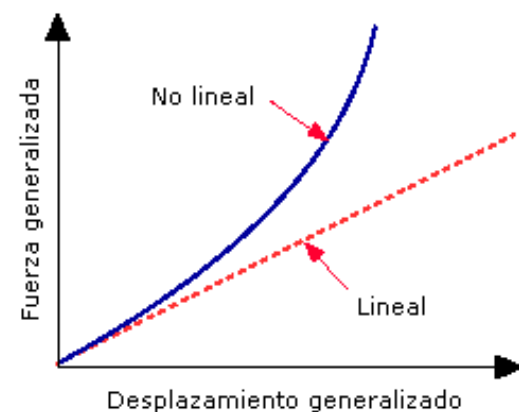
invima
Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos

Precisión Intermedia



- Criterios de aceptación:
- Realizar la prueba-F, los resultados no deben ser estadísticamente distintos.
- Típicamente, alrededor de 2 veces la s o el CV% de la repetibilidad.
- Sin embargo, una diferencia estadística puede no ser significativa (consideración práctica). Necesidad de evaluar la aptitud para la indicación de los métodos
- <2% para metodologías cromatográficas y volumétricas
- <3% Métodos químicos o espectrofotométricos
- < 5% Métodos biológicos.
- Valores superiores deben ser justificados
- Se pueden emplear otros métodos estadísticos apropiados que sustenten que la precisión del método es apropiada.

Linealidad

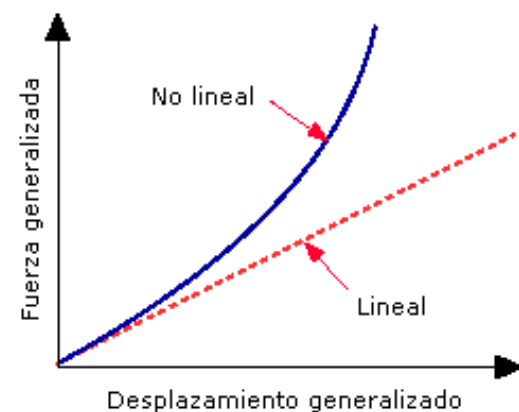


Definición

Es la capacidad del método y del sistema de producir resultados que son directamente proporcionales a la concentración de analito en un intervalo dado.

- 5 niveles de concentración. Distintas diluciones de una solución madre o distintas pesadas del componente.
- 3 muestras por nivel

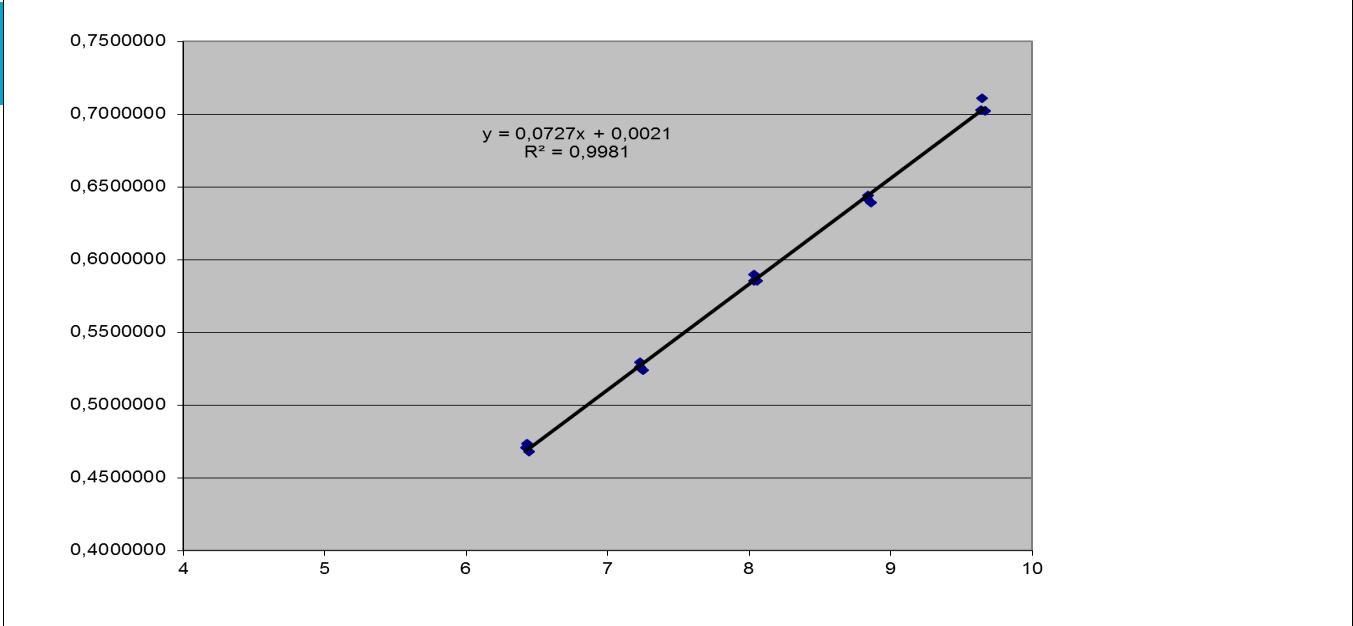
Linealidad



Rangos de concentración recomendados:

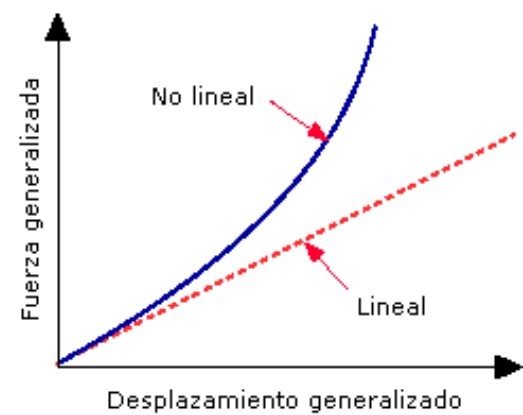
- Valoración de principio activo: 80,0% - 120,0%
- Uniformidad de dosis: 70,0% - 130,0%
- Impurezas: 50% - 120%
- Pruebas de disolución: $\pm 20\%$ del intervalo especificado

Linealidad



Concentración mg/ mL	Respuesta				
	0,0064	0,0072	0,0080	0,0088	0,0096
Lectura 1	0,4706752	0,5259767	0,5855678	0,6421731	0,7027299
Lectura 2	0,4679732	0,5242096	0,5856041	0,6395017	0,7024012
Lectura 3	0,4734671	0,5296143	0,5896733	0,6440474	0,7109201

Linealidad



Análisis del Coeficiente de Correlación

Al realizar el análisis de coeficiente de correlación $t_{\text{calculado}} > t_{\text{tabulado}}$, se concluye si existe correlación entre las dos variables analizadas.

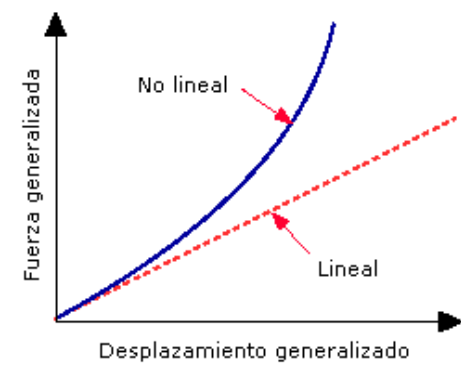
$t_{\text{calculado}} = r \sqrt{(n-2) / (1-r^2)}$

Grados de libertad	Coeficiente de correlación r	r ²	t calculado
13	0,9988	0,9977	74,979

$t_{\text{tabulado}} (13; 0,05) = 2,160$

Linealidad

Coeficiente beta-T student

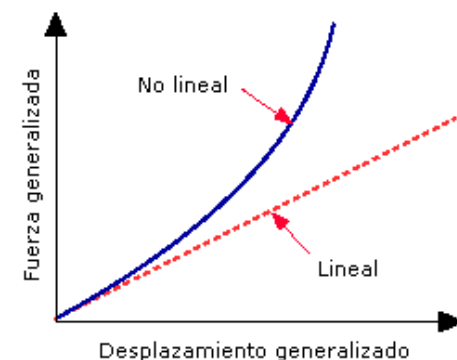


En los cálculos del coeficiente beta los resultados deben demostrar que para la pendiente $t_{\text{calculado}} > t_{\text{tabulado}}$ y para el intercepto $t_{\text{calculado}} < t_{\text{tabulado}}$, con lo cual se concluye si la pendiente es estadísticamente diferente de cero y que el intercepto no lo es.

	t calculado	t experimental	Límite Superior	Límite Inferior	CONCEPTO
pendiente	465,44	2,16	224994292,59	222915258,51	Cumple
intercepto	2,04	2,16	41880,79	-4940,14	Cumple
T(tabulado (13:0,05)=2,16					

- a superior = $a + S_a \cdot t_{\text{tabla}}$
- a inferior = $a - S_a \cdot t_{\text{tabla}}$
- b superior = $b + S_b \cdot t_{\text{tabla}}$
- b inferior = $b - S_b \cdot t_{\text{tabla}}$

Linealidad



Métodos para determinar la linealidad

➤ Método de mínimos cuadrados

- $tr = (r * \sqrt{(n-2)}) / \sqrt{(1-r^2)}$
- $ta = a / Sa$
- $tb = b / Sb$
- $Sa = \sqrt{(Sb * (\sum x^2 / n))}$
- $Sb = \sqrt{(S^2_{yx} / (\sum x^2 - ((\sum x)^2 / n)))}$

- $S^2_{yx} = (\sum y^2 - a \sum y - b \sum xy) / (n - 2)$
- $a \text{ superior} = a + Sa * t_{\text{tabla}}$
- $a \text{ inferior} = a - Sa * t_{\text{tabla}}$
- $b \text{ superior} = b + Sb * t_{\text{tabla}}$
- $b \text{ inferior} = b - Sb * t_{\text{tabla}}$

➤ Análisis de Residuales



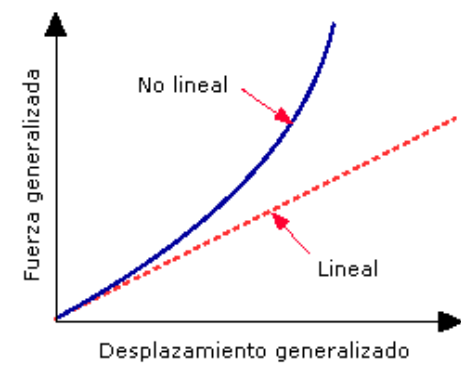
GOBIERNO
DE COLOMBIA



MINSALUD

invima
Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos

Linealidad



Análisis de varianza - Anova

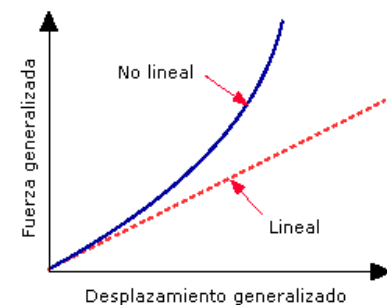
En el análisis de varianza se debe obtener para la regresión que el $F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabulado}}$, por lo que se ratifica si existe regresión entre las dos variables, además, en el desvío $F_{\text{calculado}} < F_{\text{tabulado}}$, con lo cual se demuestra si en el rango seleccionado de trabajo existe completa linealidad y no hay desvíos positivos ni negativos de la misma.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculado	F tabulado
Regresión	1	0,0632085997	0,0632085997	5621,8	4,67
Error	13	0,0001461640	0,0000112434		
Desvío	3	-0,0492577661	- 0,0164192554	1,18	3,71
Dentro	10	0,0494039301	0,0049403930		
Total	14	0,0633547637			

$f_{\text{tabulado}}(1;13;0,05) = 4,67$

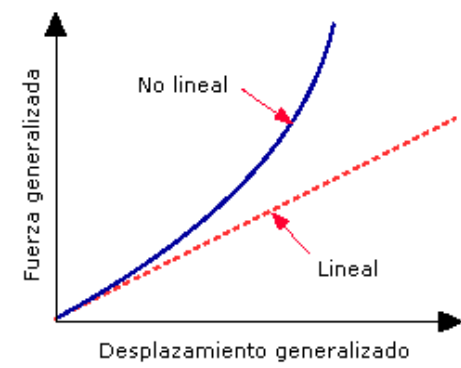
$f_{\text{tabulado}}(3;10;0,05) = 3,71$

Linealidad

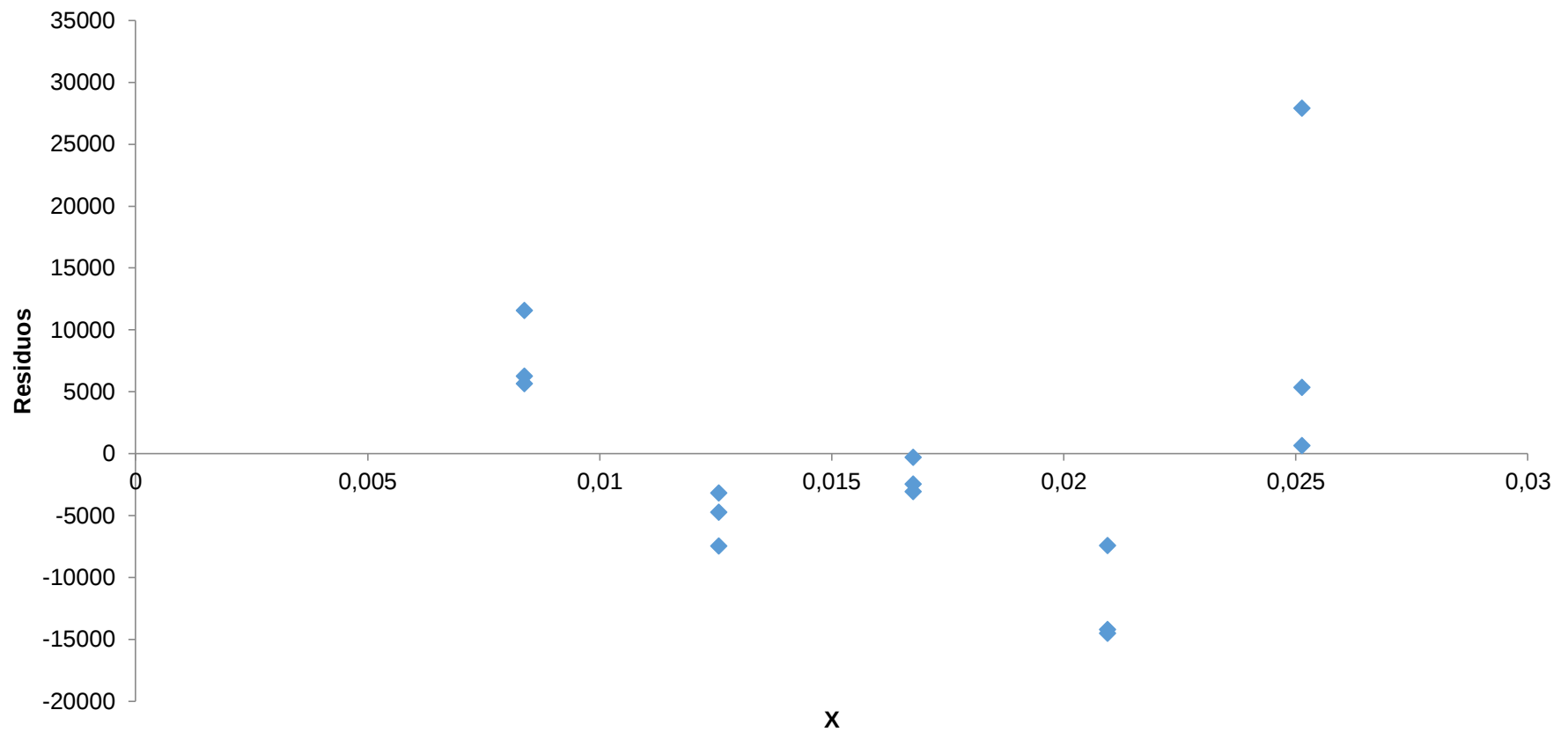


Fuente de variación	Grados de libertad (gl)	Suma de cuadrados (SC)	Cuadrado medio (CM)	F calculado	F tabla
Regresión	1	$(S_{xy})^2 / S_{xx}$	SC / gl	CM _{regresión} / CM _{error}	4,67
Error	n - 2	$[\sum y^2 - (\sum y)^2 / n] - [(\sum xy)^2 * S_{xx}]$	SC / gl		
Desvío	K - 2	$SC_{error} - \sum (\bar{y} - y_i)^x$	SC / gl	CM _{desvío} / CM _{dentro}	3,71
Dentro (residuo)	n - K	$\sum (\bar{y} - y_i)^2$	SC / gl		
Total	n - 1	$\sum y^2 - (\sum y)^2 / n$			

Linealidad



X Gráfico de los residuales



Exactitud



Es la proximidad entre los resultados de la prueba obtenidos mediante el procedimiento y el valor verdadero. La exactitud del procedimiento analítico debe establecerse durante todo su intervalo



Exactitud

5 maneras de determinar la exactitud

- Prueba de un Estándar de Referencia
- Mezcla con excipientes (placebo con una cantidad agregada conocida)
- Agregado 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).



Exactitud

La ICH recomienda se evalúe utilizando mínimo 9 determinaciones sobre mínimo tres niveles de concentración, cubriendo el intervalo especificado.

Puede evaluarse de varias maneras, incluyendo la recuperación del analito en todo el intervalo de valoración, evaluando la linealidad de la relación entre las concentraciones estimadas y las reales.



Exactitud

Adición	80 %	100 %	120 %
Resultados de análisis	100,821	102,334	100,292
	98,768	100,779	99,291
	98,636	101,507	101,696
N° datos válidos	3	3	3
Promedio	99,41	101,54	100,43
Desviación estándar	1,23	0,78	1,21
Coeficiente de variación %	1,23	0,77	1,20
Recuperación %	99,4	101,5	100,4



Exactitud

Criterio de aceptación:

En la prueba estadística t student se debe obtener un t_{exp} menor que el t_{tabla} , es decir que no hay diferencia significativa entre el porcentaje de recuperación de la cantidad obtenida con la cantidad etiquetada.

Linealidad: El estadístico de preferencia es que el intervalo de confianza para la pendiente este comprendido en un intervalo alrededor de 1,0.

98%- 102% parámetros cromatograficos y volumétricos; $CV \leq 2\%$

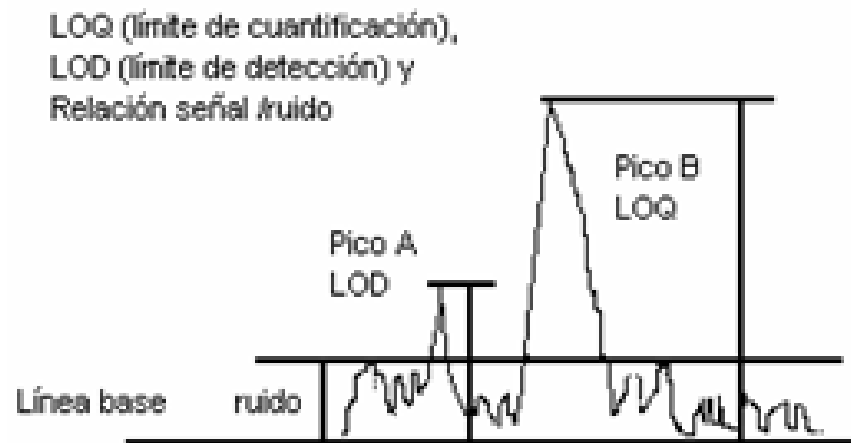
97%-103% Químico o espectrofotométrico; $CV \leq 3\%$



Exactitud

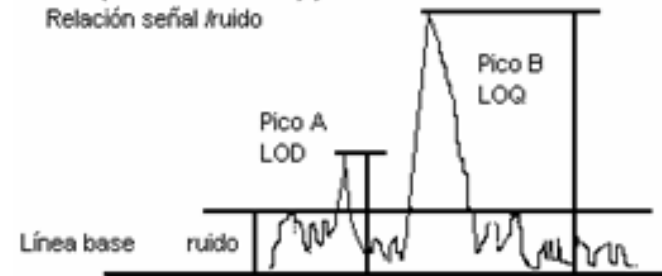
- Estadísticos de Prueba:
- Prueba G
- $t_{exp} = \frac{\delta_{max}^2}{\sum \delta_i^2}$
- Prueba para la Recuperación
- $t_{calc} = \frac{[100 - \% R]}{S * \sqrt{n}}$
- $t_{calc} > t_{crit}$ (hay diferencia estadísticamente significativa), los resultados reportados deberán ser corregidos

Limite de Detección



Corresponde a la menor cantidad / concentración de una sustancia que se puede detectar con certeza pero no necesariamente cuantificar al aplicarse el método en las condiciones establecidas, se expresa en unidades de concentración

LOQ (límite de cuantificación),
LOD (límite de detección) y
Relación señal /ruido



Limite de Detección

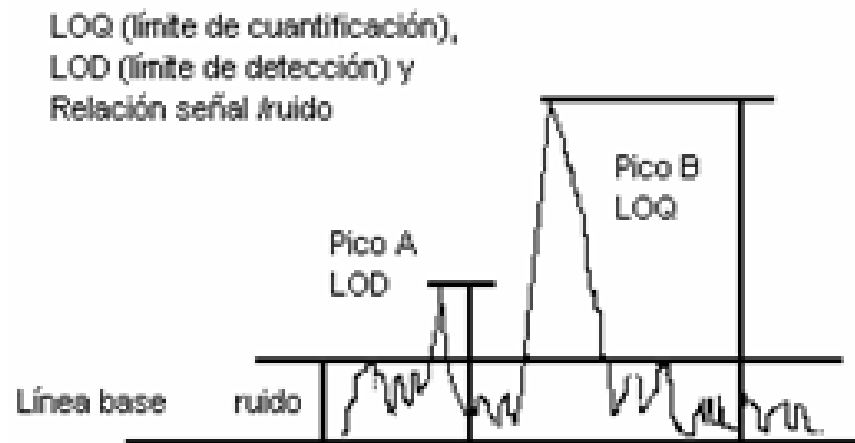
Métodos no instrumentales:

Se realiza mediante el análisis de muestras con concentraciones conocidas de analito, estableciendo el nivel mínimo de analito que se puede detectarse confiablemente.

Métodos instrumentales:

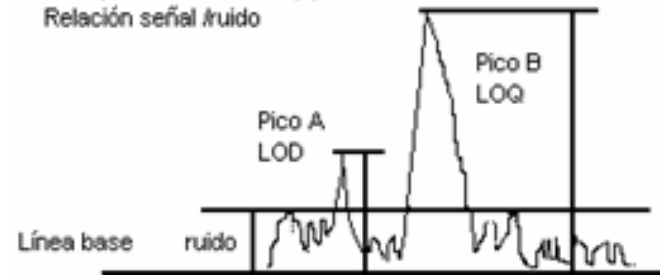
Se puede emplear el mismo enfoque de métodos no instrumentales o, en el caso de métodos instrumentales que presenten ruido de fondo, consiste en comparar las señales medidas a partir de muestras con bajas concentraciones conocidas de analito con las muestras blanco, las relaciones señal ruido aceptables son generalmente 2:1 o 3:1.

Limite de Cuantificación



Corresponde a la menor cantidad / concentración de una sustancia que se puede cuantificar con certeza , con exactitud y precisión, al aplicarse el método en las condiciones establecidas, se expresa en unidades de concentración

LOQ (límite de cuantificación),
LOD (límite de detección) y
Relación señal /ruido



Limite de Cuantificación

Métodos no instrumentales:

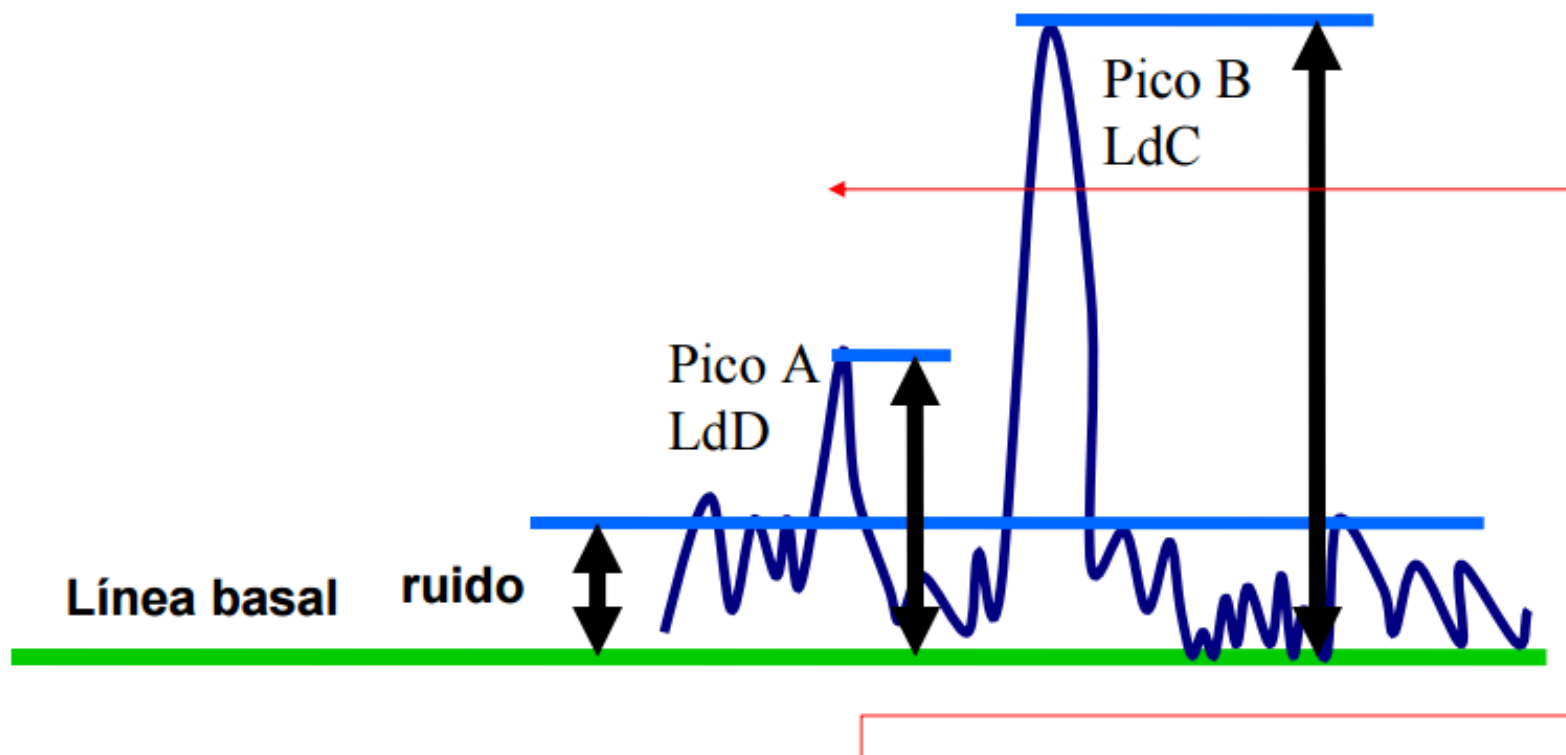
Se realiza mediante el análisis de muestras con concentraciones conocidas de analito, estableciendo el nivel mínimo de analito que se puede cuantificar con exactitud y precisión.

Métodos instrumentales:

Se puede emplear el mismo enfoque de métodos no instrumentales o, en el caso de métodos instrumentales que presenten ruido de fondo, consiste en comparar las señales medidas a partir de muestras con bajas concentraciones conocidas de analito con las muestras blanco, las relaciones señal ruido aceptables son generalmente 10:1.

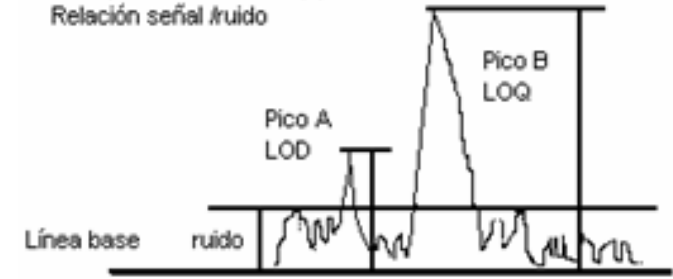
Independiente del enfoque empleado, el límite de cuantificación, debería validarse posteriormente mediante el análisis de un número adecuado de muestras que se sepa están cerca o en el límite de cuantificación.

Limite de Cuantificación



Cromatograma que muestra el ruido de línea base

LOQ (límite de cuantificación),
LOD (límite de detección) y
Relación señal /ruido



Límite de Cuantificación

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

a.- Ruido: Límite Detección = $3 \times R$ Límite Cuantificación = $10 \times R$ b.

- Se resta el blanco:

$$\text{Límite Detección} = \frac{3,3 \cdot DSb}{m}$$

$$\text{Límite Cuantificación} = \frac{10 \cdot DSb}{m}$$

c.- No se lee el blanco:

$$\text{Límite Detección} = Yb + 3,3 DSb$$

$$\text{Límite Cuantificación} = Yb + 10 DSb$$

Robustez



Es la medida de la capacidad de una técnica analítica para no ser afectada por variaciones pequeñas, aunque deliberadas, en los parámetros del procedimiento indicados en la documentación, y provee una indicación de su aptitud durante condiciones normales de uso.

Robustez



- Para esta determinación se aplica el **Test de Youden y Steiner**, para la evaluación de la robustez de un método químico analítico. Este procedimiento permite evaluar el efecto de siete variables con solo ocho análisis de una muestra.
- Para proceder a realizar el estudio de robustez se deben identificar aquellos factores del método que posiblemente afectarían los resultados finales obtenidos a través de este.
- Estas factores están presentes habitualmente en el método (ejemplo: temperatura, composición de fase móvil o soluciones reactivas, pH de solución, tamaño de celda espectrofotométrica, flujo gas carrier, split, etc.).



Robustez

Tabla N° 3: Prueba de Robustez de Younden y Steiner

Valor de la condición variable	ANALISIS							
	1	2	3	4	5	6	7	8
A,a	A	A	A	A	a	a	a	a
B,b	B	B	B	b	B	b	b	b
C,c	C	c	C	c	C	c	C	c
D,d	D	D	d	d	d	d	D	D
E,e	E	e	E	e	e	E	e	E
F,f	F	f	f	F	F	f	f	F
G,g	G	g	g	G	g	G	G	g
RESULTADOS	s	t	u	v	w	x	y	z



Robustez

A partir de los resultados puede calcularse el efecto de cada una de las variables haciendo la media de los cuatro análisis que contienen la variable en su valor mas alto (mayúscula) y aquellas que corresponden al valor mas bajo (minúscula). Así, para evaluar el efecto de la primera variable obsérvese que:

$$\frac{(s + t + u + v)}{4} = \frac{4A}{4} = A \quad \text{y} \quad \frac{(w + x + y + z)}{4} = \frac{4a}{4} = a$$

Se determina si hay efecto en las variables si el valor obtenido es mayor a $s \cdot \sqrt{2}$ donde :

s: es la desviación estándar obtenida en la repetibilidad del método

Informe de Validación

TABLA DE CONTENIDO

1. NOMBRE
2. FECHA DE EMISION DEL INFORME
3. OBJETIVO
4. REFERENCIAS
5. RESPONSABILIDADES
6. ALCANCE
7. VALIDACIÓN
 - 7.1. PERSONAL QUE REALIZA LA VALIDACIÓN
 - 7.2. ESPECIFICACIONES DEL PRODUCTO
 - 7.3. EQUIPOS
 - 7.4. MATERIALES
 - 7.4.1. ESTANDÁRES



Informe de Validación

TABLA DE CONTENIDO

7.4.2. REACTIVOS

7.4.3. MATERIAL VOLUMETRICO

8. RESULTADOS DE LA VALIDACIÓN

9. ESTIMACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE

9.1. CONTROLES POR ERRORES SISTEMÁTICOS

9.2. IDENTIFICACIÓN DE LAS FUENTES DE INCERTIDUMBRE

9.3. FUENTES DE INCERTIDUMBRE QUE INTERVIENEN EN EL PROCESO

9.4. EVALUACIÓN DE LOS COMPONENTES PRINCIPALES

9.5. CONCLUSIONES DE LA ESTIMACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE

10. CONCLUSIONES DE LA VALIDACIÓN

11. DECLARACIÓN DE CONFORMIDAD DEL MÉTODO VALIDADO

12. ANEXOS





Verificación, de Métodos Analíticos

Verificación de Métodos

- Los Laboratorios Nacionales Oficiales, generalmente no requieren llevar a cabo "la validación completa de un método analítico" a menos que hayan desarrollado el método.
- Una excepción puede ser cuando están investigando un "Resultado Fuera de Especificaciones".
- Sin embargo, se puede requerir un procedimiento para verificar que un método analítico publicado en una Farmacopea o validado por un fabricante de productos farmacéuticos, es apropiado para un producto medicinal en particular.



Validación WHOGPPQCL16.3

- Los métodos de la farmacopea se consideran validados para el uso previsto según lo prescrito en la monografía (s).
- Sin embargo, el laboratorio también debe confirmar que, por ejemplo, cuando un producto farmacéutico terminado se examina por primera vez, no hay interferencia debidas a los excipientes presentes, o que para que un API, las impurezas procedentes de una nueva ruta de síntesis se diferencian de forma adecuada.
- Si el método de la farmacopea, se adapta para otro uso, entonces debe ser validado (verificado) para demostrar que es apto para esté propósito.



Validación Vs Verificación

Glosario OMS GPPQCL

- Validación de un procedimiento analítico

Proceso documentado por el cual se demuestra que un procedimiento analítico (o método) es adecuado para su uso previsto.

- Verificación de un procedimiento analítico

Proceso por el que se demuestra un método de farmacopea o un procedimiento analítico validado es adecuado para el análisis a realizar.

Términos utilizados en esta presentación

- Verificación = validación limitada - confirma si es adecuado para su uso.
- Revalidación = confirmación de que un método originalmente validado o verificado por el laboratorio sigue siendo adecuado para su uso después de una modificación / mejora o cambio.



Validación Vs Verificación

Verificación de los procedimientos analíticos?

¿Qué hay que probar?

Los aspectos críticos de un procedimiento analítico son:

- El analito y Material de Referencia - ¿Son los mismos que en el procedimiento de la farmacopea (sales, ésteres, etc.)
- Preparación de soluciones de muestras y de referencia
- El procedimiento de ensayo (por ejemplo, condiciones del equipo de HPLC)
- El método de cálculo de los resultados
- Los cromatogramas producidos (co-elución de los picos de excipiente o presencia de picos de excipientes durante el análisis de impurezas)
- Las pruebas de aptitud del sistema

Validación Vs Verificación



Verificación - ¿Qué puede salir mal?

Preparación de la solución de ensayo

Extracción incompleta del analito

- El método requiere agitación (¿agitador orbital u otro?)
- El método requiere "sonicación" (Grado de energía del baño ultrasonido)
- La metodología del fabricante o de la Farmacopea no suele describir el equipo
- Una prueba de verificación debe investigar la eficacia y la integridad del procedimiento de extracción "
 - Variar los tiempos de agitación y otros parámetros de solubilización

Validación Vs Verificación



Verificación - ¿Qué puede salir mal?

- El laboratorio de ensayo, no siempre tendrá un método completo. La metodología analítica del fabricante es a menudo ajustada (y no necesariamente documentada).
- Los analistas del laboratorio fabricante son conscientes si hay problemas con, por ejemplo, adsorción de la sustancia activa por los filtros.
- Ocasionalmente las sustancias activas pueden ser adsorbidas por el material de vidrio.
- Esto puede resultar en situaciones o resultados fuera de especificaciones.

Validación Vs Verificación



Verificación - ¿Qué puede salir mal?

- Con un producto genérico nuevo, la formulación puede contener excipientes (antioxidantes, antimicrobianos, etc.), y éstos pueden interferir con los cromatogramas obtenidos para pruebas como la de impurezas relacionadas.
- Puede interferir con el ensayo por co-elución (El fabricante del producto puede tener metodología específica no farmacopeica).
- Las nuevas fuentes del Ingrediente Farmacéutico Activo API pueden tener nuevos perfiles de impureza.
- Los laboratorios no pueden tener acceso a toda la información y/o placebo.



Validación Vs Verificación

Verificación / Validación - ¿Cuándo debe hacerse?

- El laboratorio debe validar completamente TODOS los métodos desarrollados para uso propio.
- Verificación (validación limitada) se realiza para métodos previamente validados (ya sea de la farmacopea o un fabricante) que se utilizan en el laboratorio para
 - la primera vez ("Método Nuevo"), o
 - un "producto nuevo" (producto que contiene una API no proporcionada previamente para su análisis en el laboratorio o un producto genérico nuevo, por ejemplo, Fabricante Nuevo/ Nueva formulación)

Verificación Requerimientos

- Los requerimientos de una verificación a realizar dependerá de las circunstancias reales de uso.
- El alcance de la verificación debe ser definido, considerando que podría salir mal y los resultados documentados de un análisis de riesgo.
- Ejemplos:

En ejemplos es esencial para la preparación de soluciones una metodología eficiente, completa y repetible para TODAS las muestras a ser analizadas.

Los métodos farmacopeicos han sido validados para garantizar que los procedimientos permiten cambios menores en la composición de fase móvil, etc.

Verificación Requerimientos

Métodos nuevos

La primera vez que un método nuevo se utiliza en el laboratorio, debe realizarse un procedimiento documentado para verificar que los siguientes parámetros del ensayo son manejados apropiadamente:

- Exactitud
- Precisión (repetibilidad)
- Para los métodos cromatográficos comprobar que la columna seleccionada para realizar el ensayo es adecuada y equivalente a la utilizada por el equipo de desarrollo de métodos (confirmar que los resultados obtenidos no son afectados por el uso de columnas de distintos proveedores)
- Eficiencia de la preparación de la muestra - Asegurarse de que el método de extracción es adecuado y permite la extracción completa y repetible del analito.



Verificación Requerimientos

Productos Nuevos

Los productos nuevos contienen un API que no ha sido analizado previamente en el laboratorio – Realizar verificaciones para determinar la idoneidad de la metodología.

Productos Genéricos Nuevos

Chequear y confirmar que un método previamente validado es apropiado para analizar un producto con formulación diferente. Es necesario confirmar que el método de extracción es completo y eficiente.

Uso Nuevo par un Método Corriente

Chequear para confirmar que el procedimiento es apropiado, exacto, preciso, linear para el nuevo propósito. Se debe confirmar que el procedimiento de extracción del analito es completo y reproducible.

Verificación Requerimientos



Verificación de un método validado siguiendo modificaciones/mejoras o cambios

➤ Los laboratorios deben tener varias razones para modificar procedimientos ya validados, por ejemplo,

Cambiar columnas

Cambiar fases móviles

Cambiar los métodos de preparación de las soluciones a ensayar

➤ Los requerimientos de verificación dependen de la modificación propuesta. Las farmacopeas usualmente permiten cambiar la composición para obtener un Tiempo de Retención adecuado (usualmente $\pm 10\%$).

Verificación Requerimientos



- Si el laboratorio modifica o mejora la metodología, incluyendo cambios del método de preparación de las muestras más allá de los cambios menores permitidos por la farmacopea, o el método corriente, se requiere una nueva validación.
- El laboratorio debe confirmar que los resultados obtenidos son inmodificables y el “Nuevo Procedimiento” es Repetible, Exacto y Robusto.

Verificación Requerimientos

¿Cuándo se debe hacer?

La verificación/validación de un método se debe realizar siempre para soportar una investigación de OOS (Incidentes Fuera de Especificaciones, incluido el no cumplir con la adecuabilidad del sistema).

Los siguientes ensayos deben ser considerados (estos pueden proteger al laboratorio de hacer “falsos positivos”) y confirmar la robustez del procedimiento:

Eficiencia de la extracción

Estabilidad del analito en un vial

Linealidad

Blanco

Confirmación de la adecuabilidad de las Sustancia de Referencia

- Equivalencia de columnas
- Variando la Fase Móvil permite confirmar la ausencia de co-elución.



Transferencia Técnica



La Transferencia Técnica es Diferente!

- Es la confirmación documentada de que un laboratorio puede transferir una metodología analítica de otro laboratorio.
Por ejemplo. El laboratorio de análisis debe transferir una metodología analítica en cooperación con el fabricante. La cooperación debe ser mediada.
- La transferencia es confirmada por el laboratorio B (laboratorio de análisis oficial) repitiendo satisfactoriamente los resultados con un set de muestras pre analizadas por el laboratorio A (laboratorio del Fabricante).
- Los dos laboratorios son capaces de intercambiar información y proveer asistencia durante todo el proceso de transferencia.

Diferencias en Expectativas



Laboratorios Nacionales Regulatorios

- Usualmente realizan ensayos confirmatorios de conformidad/vigilancia.
- A menudo se ensayan productos genéricos diferentes de varios fabricantes/formulaciones (“Encuestas del mercado”).
- Puede tener acceso al reporte de validación del fabricante.
- En el trabajo de rutina es probable usar OOS o resultados atípicos para generar una verificación o validación del método.

La metodología puede ser una fuente de OOS cuando se analicen productos genéricos diferentes, con un método farmacopeico o con un “Protocolo de Vigilancia”



GOBIERNO
DE COLOMBIA



MINSALUD

invima
Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos



Laboratorio Independiente (NGO/Comercial)

- Puede realizar ensayos de liberación y/o conformidad, dependiendo del cliente.
- Puede ensayar productos diferentes.
- Necesariamente no tiene acceso al reporte de validación del fabricante.
- Puede ser difícil validar un método sin la información de la formulación, acceder a los resultados de la compañía, placebos, etc. (También puede aplicar a Laboratorios Nacionales Regulatorios)
- Puede realizar ensayos e investigaciones dependiendo de las instrucciones del cliente.

Diferencias en Expectativas



Laboratorio del Fabricante

- Realiza ensayos de liberación en contraposición a ensayos de conformidad. Probablemente analicen solo algunos genéricos diferentes.
- Tienen acceso a los reportes originales de validación y entender completamente el producto que estén analizando.
- Probablemente mejoran continuamente la metodología de ensayo, para incrementar el rendimiento y optimizar los recursos del laboratorio.

La metodología no es fuente de OOS (Resultados Fuera de Especificaciones)

Diferencias en Expectativas



Laboratorio del Fabricante

- Realiza ensayos de liberación en contraposición a ensayos de conformidad. Probablemente analicen solo algunos genéricos diferentes.
- Tienen acceso a los reportes originales de validación y entender completamente el producto que estén analizando.
- Probablemente mejoran continuamente la metodología de ensayo, para incrementar el rendimiento y optimizar los recursos del laboratorio.

La metodología no es fuente de OOS (Resultados Fuera de Especificaciones)

Verificación y Validación de Métodos Analíticos (Ejemplos)

Verificación de Métodos: Ejercicio 1



Un laboratorio desarrolla un procedimiento analítico para la determinación del contenido de un Ingrediente Activo anti- inflamatorio no esteroide en tabletas usando HPLC. El método se basa en un artículo publicado en una revista científica y el manual de un fabricante de columnas Europeo.

- ¿Qué puntos deben ser considerados en la elaboración del protocolo de validación?
- ¿Cuáles serían los parámetros para una validación exitosa?
- ¿Qué pruebas se deben realizar para la validación ?

Verificación de Métodos: Ejercicio 1



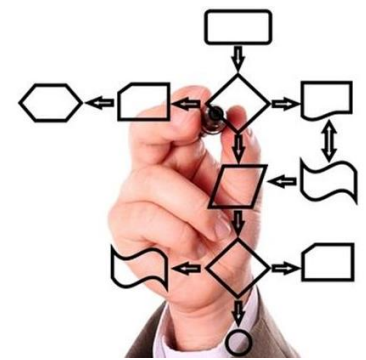
- Se requiere una validación completa e integral.
- Es necesario tener en cuenta que el método debe ser desarrollado plenamente en el laboratorio (In-House).
 - Los métodos de publicaciones científicas y manuales probablemente no fueron desarrollados utilizando insumos que estén disponibles en el laboratorio.
 - No se cuenta con evidencias de que el método ha sido sometido a una validación completa.

Verificación de Métodos: Ejercicio 1



Parámetros: Estos pueden variar dependiendo del tipo de muestra a ser analizada.

- Para API (Ingrediente Farmacéutico Activo) –
 - Exactitud, Comparar los resultados con el método corriente o monografía de la farmacopea
 - Especificidad, asegurar que el analito y otras sustancias relacionadas se separan adecuadamente
 - Reproducibilidad
 - Linealidad
 - Una prueba para confirmar que la eficiencia de la separación no se afecta por cambios en la composición de la fase móvil , o el pH de los componentes de fase móvil.
- Para probar este parámetro variar la composición de la fase móvil +/- 10 % y el pH unidades de +/- 0,1 pH.
- Una prueba para confirmar que la eficiencia de separación no se efectúa por cambios en el flujo de la fase móvil.

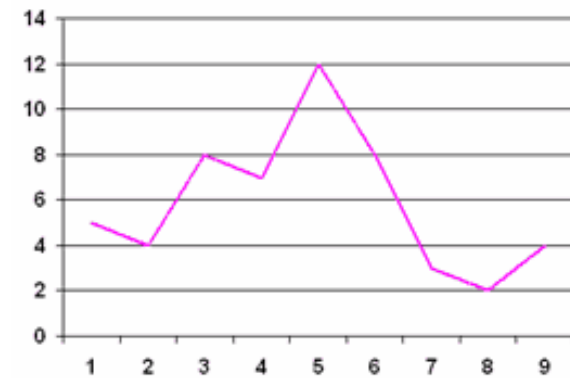


Verificación de Métodos: Ejercicio 1

La aplicación de las pruebas DEBE estar descrita en un POE. Se deben realizar las pruebas de manera que sean rigurosas, científicas y defendibles. Se deben tener los datos que soporten el protocolo de validación.

- Especificidad - Análisis independientes por duplicado. Diferentes días, analistas y equipos de HPLC.
- Confirmación de la eficacia de la extracción de analito - extracciones por triplicado en 2 días diferentes, diferentes analistas
- Precisión - Ver Reproducibilidad.
- Reproducibilidad - Combinar con la precisión y la eficiencia de extracción -Análisis de triplicados independientes, 2 analistas en 2 días diferentes empleando 2 equipos de HPLC diferentes

Verificación de Métodos: Ejercicio 1



- Linealidad - 5 soluciones de entre 80 y 120% de la concentración de analito producen una grafica de entrada Vs determinado $r^2 > 0,999$
- Una prueba para confirmar que la eficiencia de la separación no se efectúa por cambios en la composición de la fase móvil, o el pH de los componentes de fase móvil.

Para probar este parámetro variar la composición de la fase móvil por +/- 10% y el pH +/- 0,1 pH unidades.

- Una prueba para confirmar que la eficiencia de separación no se efectúa por cambios en el flujo de la fase móvil

Verificación de Métodos: Ejercicio 1



Para tabletas

- Especificidad - verificar que los excipientes y las sustancias relacionadas no coeluyen
- Confirmar la eficacia de la extracción del analito
- Exactitud - Comparar los resultados con el método actual (o la monografía de la Farmacopea)
- Reproducibilidad
- Linealidad
- Confirmar si la eficiencia de la separación no se afecta por cambios en la composición de la fase móvil, o el pH de los componentes de fase móvil.

Para probar este parámetro variar la composición de la fase móvil por $\pm 10\%$ y pH por unidad de $\pm 0,1$ pH .

Verificación de Métodos: Ejercicio 1



- ✓ Debe desarrollarse una prueba de idoneidad o aptitud del sistema adecuada
- ✓ Una validación sólo puede ser requerida por el tipo de columna empleada

Si en el futuro una columna diferente va a ser utilizado se debe realizar una verificación adecuada para su uso

Verificación de Métodos Ejercicio 2

Un laboratorio realiza la VALORACIÓN del contenido de un Ingrediente Activo en tabletas por HPLC (Detección UV, 254 nm). El método se basa en un método publicado en una farmacopea, desarrollado y validado originalmente para determinar el contenido de sustancias relacionadas en el Ingrediente Farmacéutico.

- ¿Qué puntos deben ser considerados en la elaboración del protocolo de validación?
- ¿Qué parámetros debe ser incluidos en el protocolo de validación?
- ¿Qué pruebas se deben realizar para la validación?

Verificación de Métodos Ejercicio 2



- ***Puntos a tener en cuenta***
- El método original fue desarrollado para otro propósito
 - validado para cuantificar las sustancias relacionadas que se esperan del Ingrediente Farmacéutico Activo.
 - No se puede asumir la validación de una prueba de VALORACIÓN.
 - Se debe demostrar que el método es adecuado y apropiado para el uso previsto
- Parámetros de verificación requeridos:
 - Exactitud, reproducibilidad , linealidad
 - Demostración de la eficiencia y la reproducibilidad de la extracción del analito a partir de las tabletas

Verificación de Métodos Ejercicio 3

Un laboratorio recibe tabletas de un producto genérico nuevo, de un fabricante que no habían analizado antes. Sin embargo, han analizado otros productos que contiene el mismo ingrediente activo, empleando el método de la farmacopea oficial. Ellos deben realizar las pruebas de Valoración, Sustancias Relacionadas y Disolución, usando este método.

- ¿Qué verificaciones del método se requieren para el producto nuevo?
- ¿Qué puntos debe ser incluidos en el protocolo de validación?
- ¿Cuáles son los parámetros a tener en cuenta para una verificación exitosa?
- ¿Qué pruebas se deben realizar?

Verificación de Métodos Ejercicio 3

Este es un ejemplo del ejercicio de verificación más común que un " Laboratorio de Control Oficial " tendrá que realizar. Los productos genéricos nuevos suelen ser recibidos para su análisis. Los métodos analíticos a menudo están disponibles en las monografías de la farmacopea. Sin embargo, el laboratorio no puede asumir que el método es adecuado para todos los productos.

- El método ha sido validado en términos de exactitud, reproducibilidad y robustez.

Sin embargo, el laboratorio debe verificar que es apropiado para todos los productos sometidos a prueba – es necesario concentrarse en el producto a ensayar en lugar de la metodología.

Verificación de Métodos Ejercicio 3



Parámetros a verificar:

- Especificidad - ¿Los excipientes interfieren / coeluyen? Asegúrese de NO encontrar picos inesperados en el cromatograma para la prueba de interferencias excipientes.
- ¿El procedimiento de extracción del analito es apropiado?
 - ¿El analito es extraído eficientemente, completamente y reproduciblemente?
 - Ensayar variando el procedimiento de extracción, agitación, tiempo de sonicación para obtener resultados exactos Y reproducibles.



GOBIERNO
DE COLOMBIA



MINSALUD

invima
Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos