



GARANTÍA DE CALIDAD DE MEDICAMENTOS

UNIDAD TEMÁTICA 7: VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

LA VALIDACIÓN DE LOS MÉTODOS ANALÍTICOS ES UN REQUISITO DE LAS BUENAS PRÁCTICAS DE FABRICACIÓN Y CONTROL

GLOSARIO

Métodos analíticos compendios: son aquellos métodos publicados en Farmacopeas. Estos métodos deben ser Verificados según USP <1226> o validados si fuera requerido por la autoridad sanitaria donde se pretende aprobar el producto.

Validación analítica de un método: Es la evaluación sistemática de un método por medio de pruebas experimentales para confirmar y proporcionar evidencia objetiva de que se han cumplido los requisitos específicos para su uso.

Validación parcial de un método: Es la demostración, por medio de algunos parámetros de validación, que el método analítico previamente validado posee las características necesarias para proporcionar resultados con la calidad requerida en las condiciones de su uso.

Revalidación de un método analítico: repetición parcial o total de la validación de un método

Analítico para asegurar que aún cumpla con los requisitos establecidos.

Muestra: cantidad representativa del ingrediente farmacéutico, producto intermedio o terminado, debidamente identificado, antes de la fecha de vencimiento determinada.

Ingrediente farmacéutico: toda sustancia que forma parte de la formulación de una forma farmacéutica.

Ingrediente farmacéutico activo (API): ingrediente farmacéutico que, cuando se administra a un paciente, actúa como ingrediente activo y puede tener actividad farmacológica o efecto directo en el diagnóstico, cura, tratamiento o prevención de una enfermedad o también afectar la estructura y función de cuerpo humano.

Analito: sustancia o grupo de sustancias de interés cuya identificación o cuantificación se pretende.

Matriz: composición que imita la muestra sin la presencia del analito.

Matriz compleja: aquella que contiene un número indefinido de sustancias no controladas que no pueden ser obtenidas sin la presencia del analito.



Efecto matriz: efecto de los componentes de la matriz sobre la respuesta analítica.

Impurezas: cualquier componente presente en el ingrediente farmacéutico del producto terminado que no sea el ingrediente farmacéutico activo ni el o los excipientes.

Impurezas Orgánicas: es cualquier compuesto orgánico de estructura química diferente al principio activo que puede generarse durante el proceso de manufactura y/o almacenamiento del principio activo o del producto terminado. Pueden ser volátiles o no volátiles, e incluir materiales de partida, subproductos, intermediarios, productos de degradación, reactivos, ligandos y catalizadores. Las impurezas orgánicas se clasifican de la siguiente manera:

(a) **Impureza Identificada:** Cualquier impureza para la cual la caracterización química estructural haya sido realizada.

(b) **Producto de Degradación:** producto resultante de un cambio químico en la molécula generado durante el almacenamiento, por acción de la luz, temperatura, pH, agua, o por reacción con un excipiente y/o con el sistema de envase primario (frasco/tapón).

(c) **Potencial Producto de Degradación:** una impureza que, por consideraciones teóricas, puede aparecer durante o después de la manufactura o almacenamiento del principio activo/producto terminado. Esto puede o no aparecer en el principio activo o producto terminado.

(d) **Producto de Degradación No Especificado:** Un producto de degradación que no forma parte de las especificaciones.

(e) **Producto de Degradación Especificado:** Producto de degradación identificado o sin identificar, que es seleccionado para incluirse en las especificaciones del principio activo/producto terminado y es listado individualmente y limitado para garantizar la seguridad y calidad del principio activo/producto terminado.

(f) **Producto de Degradación No Identificado:** Un producto de degradación el cual es definido únicamente por propiedades analíticas cualitativas, por ej., tiempo de retención cromatografico/ tiempo de retención relativo.

(g) **Impureza Tóxica:** Una impureza que tiene una significativa actividad biológica indeseable.

Impurezas Inorgánicas: Cualquier compuesto que pueden derivar de los procesos de manufactura. Normalmente son conocidos e identificados y pueden incluir: reactivos, ligandos, catalizadores, metales pesados, sales inorgánicas, otros materiales (ej., material de filtros).

Solventes Residuales: Líquidos orgánicos usados o producidos durante el proceso de manufactura. Estos generalmente son de toxicidad conocida y se clasifican de la siguiente manera:

(a) **Solventes Clase 1:** conocidos como carcinogénicos para el hombre, fuertemente sospechados como carcinogénicos para el hombre, y peligrosos para el ambiente.

(b) **Solventes Clase 2:** son carcinógenos no mutagénicos en animales o posibles causantes



de otras toxicidades irreversibles tales como neurotoxicidad o teratogenicidad. También se incluyen en esta clase solventes de los cuales se sospecha que generan otras toxicidades significativas pero reversibles.

(c) **Solventes Clase 3:** Esta clase no incluye solventes conocidos como peligrosos para la salud humana a niveles normalmente aceptados en productos farmacéuticos. Sin embargo, no existen estudios de toxicidad o carcinogenicidad a largo plazo para muchos de los solventes de clase 3.

Exactitud: es la proximidad entre los resultados, obtenidos por el método analítico y el valor real. Representa el grado en que un método analítico se ajusta al valor verdadero para todo propósito práctico. La exactitud expresa el grado de acuerdo entre el valor aceptado como verdadero o un valor aceptado como referencia y el valor encontrado (obtenido por el método analítico).

Precisión: es el grado de cercanía (o grado de dispersión) entre una serie de resultados individuales obtenidos cuando el procedimiento se aplica repetidamente a un muestreo múltiple de una muestra homogénea bajo las condiciones exactas requeridas para el desempeño del método. Precisión puede ser considerada en 3 niveles: Repetibilidad, Precisión intermedia y Reproducibilidad.

Especificidad: es la capacidad del método de medir exacta y específicamente el analito en presencia de sustancias que podrían estar presentes y que podrían interferir con la medición.

Pureza cromatográfica: ausencia de interferencia con la señal cromatográfica del analito.

Pureza de pico: homogeneidad espectral de un pico cromatográfico que indica su pureza cromatográfica, y los criterios para definir si hay homogeneidad espectral y los parámetros

adoptados para el cálculo de la pureza están definidos como predeterminados en el software utilizado o mediante evaluación técnica científicamente fundamentada.

Rango: es el intervalo entre el nivel superior e inferior de concentraciones (o cantidades) de un analito en el cual el método puede ser aplicado, debido a que se ha demostrado que el analito se puede determinar con un grado adecuado de precisión, exactitud y linealidad.

Linealidad: es la capacidad de un método para producir resultados que son directamente, o mediante una transformación matemática bien definida, proporcionales a la concentración (o cantidad) del analito en la muestras dentro de un rango determinado.

Factor de respuesta: relación entre la señal analítica y la concentración del analito.

Factor de respuesta relativo: relación entre los factores de respuesta que se utiliza



como corrección en el cálculo de la concentración de una sustancia cuando esa sustancia es medida por la respuesta analítica de otra sustancia.

Límite de Detección (LOD): es la menor concentración de analito en una muestra que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, utilizando el procedimiento experimental especificado. Este parámetro es especialmente útil en los “test límites” para detectar si la concentración del analito está por encima o por debajo de un cierto límite. El límite de detección es usualmente expresado como concentración del analito (%p/p, ppm, ppb) en la muestra.

Límite de Cuantificación (LOQ): es la menor concentración de analito en una muestra que puede ser cuantitativamente determinada con precisión y exactitud aceptables, utilizando el procedimiento experimental especificado. Este parámetro es útil en métodos cuantitativos de compuestos que se encuentran en pequeña concentración en la muestra, tales como impurezas en drogas a granel y productos de degradación.

Robustez: es una medida de la capacidad de un método analítico de permanecer inalterado frente a variaciones pequeñas realizadas deliberadamente en los parámetros del procedimiento los cuales son listados en la documentación del procedimiento y proveen una indicación de su adecuabilidad durante el uso normal. La Robustez puede ser determinada durante el desarrollo de un método analítico.

Parámetro de Método Analítico: cualquier factor/parámetro que forme parte del método y que puede variar o que puede ser especificado a un único nivel controlable. Por ejemplo, parámetros evaluados durante estudios de robustez (flujo, temperatura, etc.).

Parámetro Crítico del Método Analítico (PCMA): es un parámetro del método analítico cuya variabilidad presenta un alto riesgo de producir fallas en el método. Estos parámetros deben ser identificados y controlados.

System Suitability del Método: Conjunto de parámetros del método que deben ser controlados para asegurar que un método funciona adecuadamente. Algunos de estos parámetros son: resolución, factor de asimetría, tiempo de retención, especificidad (ausencia de interferencias), precisión (RSD%), sensibilidad (relación Señal/Ruido). Los parámetros de System suitability generalmente son seleccionados durante el desarrollo del método y son evaluados en los estudios de robustez. Si durante la validación se detecta la necesidad de incorporar nuevos parámetros críticos, estos deben ser detallados en la técnica analítica.

Estrategia de Control: Estrategia utilizada para asegurar que las variables críticas o de alto riesgo de los métodos (factores críticos del método analítico) pueden ser adecuadamente controladas.

**VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO**

Alcance de la validación de métodos analíticos:

Clasificación de los métodos: En la **Tabla 1** se presenta la clasificación de los métodos analíticos, según su complejidad y al grado de validación sugerida por este procedimiento. Esta tabla es aplicable a métodos desarrollados en planta tanto para materias primas (principios activos y excipientes) como para productos.

Tabla N° 1: Grado de validación sugerida según complejidad de la metodología analítica.

Métodos que no requieren validación	Métodos que requieren validación parcial ¹	Métodos que requieren validación completa ²
Pérdida de peso por secado Residuo de ignición Determinación de pH Índice de refracción Punto de fusión Pasaje por aguja, Tiempo de reconstitución Claridad y grado de opalescencia Grado de coloración Inspección visual Volumen extraíble Análisis elemental Microscopía Reacciones de identificación	Viscosidad Distribución de Tamaño de Partículas (DTP) TLC Rotación óptica. Espectroscopia cualitativa (identificación): UV / IR	Métodos cromatográficos: (HPLC, GC) Test de Disolución Titulaciones Métodos espectroscópicos cuantitativos: (UV/VIS, NMR, MS)

Parámetros Sugeridos: En general se valida especificidad (si aplica) y Precisión. Para el caso de identificaciones por UV o IR solo Especificidad. Linealidad es sugerido para títulos de principio activo. Otros parámetros pueden ser requeridos, dependiendo de cada método en particular.

Parámetros Sugeridos: Se validan los parámetros descriptos en **Tabla 4** (siempre que apliquen al método a validar).

Requerimientos de Validación según categoría de método analítico:

En este punto se describen los requerimientos de validación de métodos analíticos según las fuentes bibliográficas disponibles: USP <1225> (punto 8.1.2.1) e ICH Q2 (R1) (punto 8.1.2.2).

Según USP <1225>: Los métodos analíticos se clasifican en 4 categorías:

Categoría I: Procedimientos analíticos para la cuantificación del componente mayoritario de drogas a granel o ingredientes activos (incluyendo conservantes) en productos terminados farmacéuticos.



Categoría II: Procedimientos analíticos para la determinación de impurezas o compuestos de degradación en drogas a granel o en productos terminados farmacéuticos. Estos procedimientos incluyen ensayos cuantitativos y test límite.

Categoría III: Procedimientos analíticos para la determinación de características de performance (Por ejemplo: disolución, liberación de drogas, etc).

Categoría IV: Ensayos de Identificación.

En la **Tabla 2** se muestran los parámetros de validación requeridos por USP <1225>, según la categoría de método a validar:

Tabla N° 2: Parámetros de Validación requeridos por USP <1225>.

Parámetro Analítico	Categoría I	Categoría II		Categoría III	Categoría IV
		Cuantitativo	Test Límite		
Exactitud	Sí	Sí	*	*	No
Precisión	Sí	Sí	No	Sí	No
Especificidad	Sí	Sí	Sí	*	Sí
Límite de detección	No	No	Sí	*	No
Límite de cuantificación	No	Sí	No	*	No
Linealidad	Sí	Sí	No	*	No
Rango	Sí	Sí	*	*	No

* Puede ser requerido dependiendo del ensayo específico.



Según ICH Q2(R1): Los métodos se clasifican según se indica en la **Tabla 3. Tabla N° 3:** Parámetros de Validación requeridos por ICH-Q2(R1)

Type of analytical procedure characteristics	IDENTIFICATION	TESTING FOR IMPURITIES		ASSAY - dissolution (measurement only) - content/potency
		quantitat. limit		
Accuracy	-	+	-	+
Precision				
Repeatability	-	+	-	+
Interm. Precision	-	+(1)	-	+(1)
Specificity (2)	+	+	+	+
Detection Limit	-	-(3)	+	-
Quantitation Limit	-	+	-	-
Linearity	-	+	-	+
Range	-	+	-	+

- signifies that this characteristic is not normally evaluated

+ signifies that this characteristic is normally evaluated

(1) in cases where reproducibility (see glossary) has been performed, intermediate precision is not needed

(2) lack of specificity of one analytical procedure could be compensated by other supporting analytical procedure(s)

(3) may be needed in some cases

Requerimientos de validación de métodos analíticos en un procedimiento operativo estándar
Requerimientos para validación de métodos nuevos, desarrollados “In House”:

En la **Tabla 4** se detallan los parámetros a validar según la categoría del método analítico:

Tabla N° 4: Requerimientos para validaciones de métodos

Punto	Parámetro de Validación	Categoría I (Valoración)	Categoría II (Impureza/analito)		Categoría III (Disolución)	Categoría IV (Identificación)
			Cuantitativo	Limite		
1	Adecuabilidad del sistema (system suitability)	(a)	(a)	(a)	(a)	(a)
2	Linealidad	Si	Si	-	Si	-
3	Precisión:					
	Repetibilidad	Si	Si	-	Si	-
	Precisión Intermedia	Si	Si	-	Si	-
4	Exactitud	Si	Si	-	Si	-



5	Límite de cuantificación	-	Si	-	-	-
6	Límite de detección	-	Si	Si	-	-
7	Rango	Si	Si	-	Si	-
8	Especificidad-Interferencia	Si	Si	Si	Si	Si
9	Estudio de sesgo de filtro	(b)	(b)	(b)	(b)	-
10	Estabilidad de la solución	Si	Si	(c)	Si	-
11	Especificidad- Estudio de degradación forzada	Si (d)	Si (d)	-	-	-
12	Robustez	Si	Si	(e)	Si	-

- (a) Es aplicable si el método contiene un criterio de adecuabilidad del sistema (system suitability).
 (b) Es aplicable si el filtro es usado en la preparación de muestra.
 (c) Usar soluciones preparadas recientemente o llevar a cabo el estudio de la estabilidad de las soluciones.
 (d) Estudio de degradación forzada son requeridos para métodos de HPLC utilizados como indicadores de estabilidad y no son requerido para métodos de solventes residuales por GC.
 (e) Puede ser necesario en algunos casos.

Revalidación de métodos analíticos:

Motivos de revalidación parcial o total de métodos analíticos:

Cambio en alguno de los parámetros del método analítico que no esté contemplado en la robustez del método (se debe evaluar el impacto del cambio en cada caso).

Cambio en las especificaciones (cuando la nueva especificación se encuentre fuera del rango validado).

Cambio significativo del equipamiento utilizado para validar el método.

Modificación de alguna de las etapas de síntesis química o purificación (principio activo o excipiente).

Cambio de proveedor o síntesis de alguno de los componentes del producto (excipientes, principios activos) o cambio de alguna de las etapas de elaboración del producto. En este caso se debe evaluar el impacto del cambio y establecer los parámetros a revalidar.

Cambio en la estrategia de validación o requerimiento de actualización solicitado por entidades regulatorias, para el cumplimiento de normativas específicas.

Alcance de la revalidación de métodos analíticos:

En cada caso, se deberá evaluar el impacto del cambio sobre la metodología.



Por ejemplo:

Cambio de parámetro del método: (marca de columna, flujo, composición de fase móvil, system suitability adicional, etc.): generalmente, se debe revalidar la robustez del método.

Cambio en la preparación de la muestra: Dependiendo del cambio puede ser requerido revalidar la especificidad del método y la estabilidad de las soluciones (por ejemplo por cambio del disolvente de muestra) o la exactitud, linealidad, precisión, estabilidad de soluciones y robustez (por cambio de la concentración de análisis).

Cambio en una etapa de la síntesis del API o cambio de proveedor de API: En métodos de pureza o solventes residuales se debe evaluar el impacto del cambio sobre el perfil cromatográfico comparando el perfil anterior y posterior al cambio. Si se cambia el proveedor de API, se debe evaluar si las impurezas propias del nuevo proveedor pueden ser evaluadas con el método validado o si requieren del desarrollo y validación de un nuevo método. Se debe evaluar también los métodos utilizado para la determinación de compuestos no relacionados. El impacto del cambio debe ser evaluado en API y en el producto.

Cambios de formulación: Dependiendo del cambio se determinan los parámetros que se deben revalidar. Por ejemplo, si cambia la identidad, calidad o el proveedor de una materia prima o si se agrega un componente de la fórmula del producto, como mínimo se debe validar especificidad del método frente a ese componente, incluyendo degradaciones forzadas para métodos utilizados como indicadores de estabilidad.

Cambio de especificaciones: si las nuevas especificaciones están fuera del rango validado, como mínimo se debe revalidar linealidad y exactitud en el nuevo rango.

Cambio del equipamiento: la extensión de la revalidación depende del grado de similitud entre los equipos. Cuando el equipo nuevo no permite ajustar los parámetros descritos en el método validado, el método debe ser ajustado al nuevo equipamiento y revalidado teniendo en cuenta los parámetros descritos en la Tabla 4. Si los equipamientos son similares y operan con los mismos principios de funcionamiento, se puede realizar un ensayo de precisión para demostrar que los resultado obtenidos por ambos equipos son comparables.

Cambios que no requieren revalidación: todas aquellas modificaciones del sistema cromatográfico cuyo impacto fue evaluado durante la validación del método (espacio de diseño del método analítico).

Requerimientos de co-validación (transferencia de métodos analíticos entre áreas):

Durante las validaciones de métodos analíticos, puede realizarse co-validación entre el área de desarrollo analítico y control de calidad . En estos casos, se valida la precisión intermedia del método utilizando insumos, equipos y analistas de ambas áreas y se comparan los resultados. Se determina el cumplimiento de los criterios de adecuabilidad del sistema (system suitability) durante el ensayo de precisión intermedia. En algunos casos puede ser necesario realizar la determinación de LOQ/LOD en el área receptora (por ejemplo en métodos de pureza, si cambia el tipo de detector UV/PDA).



Si los resultados obtenidos cumplen los criterios de aceptación establecidos, el área receptora (control de calidad) se considera adecuada para realizar la determinación descripta en el método validado en el área de desarrollo analítico.

Requerimientos mínimos de validación de métodos

El método puede ser utilizado para análisis inicial de muestras de estabilidad y/o liberaciones de lotes si los puntos 1-10 (tabla 4) cumplen el criterio de aceptación y el reporte de validación fue aprobado.

El método puede ser utilizado para análisis de muestras de estabilidad si los puntos 1-11 (tabla 4) cumplen los criterios de aceptación y el reporte de validación fue aprobado.

El método puede ser utilizado bajo condiciones robustas especificadas, si los puntos 1-12 (tabla 4) cumplen el criterio de aceptación y el reporte de validación fue aprobado.

REQUERIMIENTOS DE VERIFICACIÓN DE MÉTODOS COMPENDIADOS:

Los requerimientos de verificación de métodos compendiados se establecen en función de la complejidad del método y del material a ser analizado. El grado y el alcance del proceso de verificación dependen de la complejidad del método, del nivel de entrenamiento del analista en el tipo de procedimiento y de la experiencia que este tenga en el manejo del equipo o instrumento asociado al método.

La verificación de métodos no es necesaria para los ensayos básicos (por ejemplo: metales pesados, residuo de ignición, pérdida de peso por secado, pH) realizados rutinariamente en el laboratorio. Los ensayos de KF serán verificados mediante análisis de la precisión del método, siempre y cuando no exista un motivo por el cual el procedimiento compendiado no sea adecuado para analizar el material.

En los métodos que requieran de preparación de soluciones estándar y muestra, se recomienda demostrar la estabilidad y las condiciones de almacenamiento de las mismas durante la ejecución de la verificación.

En la **Tabla 5** se presentan los parámetros mínimos sugeridos para la verificación de los métodos de análisis, según la categoría (USP) del método. Otros parámetros podrán ser verificados si se considera necesario para un método particular.

**Tabla N° 5:** Parámetros mínimos sugeridos para verificación de métodos compendiados.

Metodología	Categoría I	Categoría II		Categoría III	Categoría IV
		Cuantitativo	Test Límite		
HPLC y GC	P, E*, L	P, E*, LOQ	E, LOD	--	E
Métodos espectroscópicos	P, L	P, LOQ	E, LOD	--	E
Titulaciones	P, L	P	--	--	--
TLC (cuantitativo)	--	E, LOQ	E, LOD	--	E

P= Precisión; E= Especificidad; L= linealidad; LOD= Limite de detección, LOQ=límite de cuantificación

* Estudios de degradación forzada son requeridos en métodos HPLC indicadores de estabilidad.

PARÁMETROS DE VALIDACIÓN Y CRITERIOS DE ACEPTACIÓN SUGERIDOS

Especificidad

Análisis de Interferencias

El objetivo del análisis de interferencias es asegurar que ningún compuesto potencialmente presente en la muestra, interfiere significativamente con la cuantificación del analito.

1. En el caso de análisis cualitativos, como ser Identificaciones UV/IR, se debe demostrar la habilidad de selección entre componentes con estructura similar. Para esto, deberían ser confirmados resultados positivos, quizás por comparación con un material de referencia conocido, obtenidos a partir del análisis de muestras conteniendo el analito. Junto a éstas, se deberían analizar muestras que no contienen el analito obteniéndose así resultados negativos y confirmando que la respuesta positiva no se obtiene por materiales de similar estructura o estrechamente relacionados al analito.



2. Para métodos cuantitativos y test límite, la selectividad se demostrará verificando que la respuesta analítica se debe exclusivamente al analito en presencia del diluyente, matriz, impurezas o productos de degradación.

En el caso de procedimientos para la determinación de impurezas, la especificidad puede ser establecida por fortificación del activo o el producto con niveles apropiados de dichas impurezas; demostrando que éstas son determinadas con precisión y exactitud adecuadas.

En el caso de métodos analíticos para determinar el contenido de una sustancia (assay), la especificidad requiere la demostración de que el procedimiento no es afectado por la presencia de impurezas o excipientes. En la práctica, esto puede hacerse mediante la fortificación del activo o el producto con niveles apropiados de dichas impurezas o excipientes; demostrando que el resultado de assay no es afectado por la presencia de estos materiales extraños.

Generalmente, la especificidad es demostrada realizando las siguientes inyecciones/mediciones. Otras soluciones pueden ser analizadas si se considera necesario.

Disolvente de muestra.

Solución conteniendo las principales impurezas/solventes del producto.

Solución estándar.

Solución muestra.

Solución estándar de impurezas/solventes (si están disponibles).

Solución muestra fortificada con impurezas/solventes a la concentración del límite de la especificación (si están disponibles).

Solución Matriz (conteniendo los excipientes en las proporciones del producto).

Soluciones de Excipientes por separado (cuando la matriz presenta picos se analiza cada componente por separado para identificar a que excipiente corresponde cada señal).

Degradaciones Forzadas

Las validaciones o verificaciones de los métodos a ser utilizados como indicativos de estabilidad deben incluir ensayos de degradaciones forzadas. Los ensayos de degradaciones forzadas deben incluir, como mínimo, lo siguiente:

Análisis de la muestra sin degradar.

Análisis de la muestra sometida a condiciones de degradación (termólisis, hidrólisis ácida y alcalina, oxidación y fotólisis).

Análisis del placebo de formulación sometido a las mismas condiciones de degradación que la muestra (para degradación de productos).

Análisis del blanco de reacción conteniendo el disolvente y los reactivos (para degradación de principios activos).

Niveles de degradación:

Las condiciones de degradación deben ser ajustadas de manera de obtener niveles de degradación idealmente comprendidos entre 5% y 20%. Cuando las drogas o productos



sean altamente estables, se debe lograr, como mínimo el 5% de degradación en al menos una de las condiciones seleccionadas, o se debe realizar una justificación científica basada en bibliografía y/o a partir de los resultados obtenidos en el laboratorio.

Si se obtienen degradaciones mayores al 25%, se deben probar condiciones menos drásticas para evitar evaluar degradaciones secundarias. En estos casos es recomendable realizar ensayos, tomando muestras a diferentes tiempos de reacción.

Condiciones de degradación sugeridas

En la **Tabla 6** se muestran las condiciones sugeridas para realizar las degradaciones forzadas. La modificación de las condiciones experimentales sugeridas podrían no implicar un desvío al POE de validación de métodos analíticos (Aunque debe estar contemplada esta situación en dicho procedimiento).

Tabla N° 6: Condiciones de degradación forzada sugeridas¹

Ácido	0,1 N HCl a 40 °C por alrededor de 1 día, seguido por neutralización con dilución 0,1 N NaOH.
Base	0,1 N NaOH a 40° C por alrededor de 1 día, seguido por neutralización con 0,1 N HCl.
Calor	60-80 °C por 1-2 día(s).
Oxidación	3% H ₂ O ₂ por varias horas.
Fotólisis	UV: 200-400 W-h/m ² (un ciclo). Luz fría fluorescente blanca: 1,2-2,4 millones Lux hora.

¹ Cuando sea necesario se debe neutralizar el medio de reacción antes de inyectar la muestra para evitar dañar las columnas y/o equipos.

Condiciones de Oxidación

En el caso de la oxidación es posible emplear varias estrategias, las cuales deben ser seleccionadas según criterio científico y de acuerdo con las características del analito. Generalmente el primer oxidante que se utiliza es peróxido de hidrógeno, pero si no se obtienen resultados adecuados se pueden buscar otras condiciones de oxidación. Otras condiciones experimentales de oxidación son mostradas en la **Tabla 7:**

**Tabla N° 7:** Condiciones Típicas de Oxidación

<p>Oxidación mediante peróxido de hidrógeno (H₂O₂)</p> <p><u>Condiciones experimentales típicas:</u></p> <p><u>Para muestras solubles en agua</u> 1%-3% de H₂O₂ por varias horas. Tomar muestras a intervalos regulares. Temperatura: ambiente Solvente: agua Duración máxima: 5 días</p> <p><u>Para muestras insolubles o poco solubles en agua</u> 1%-3% de H₂O₂ por varias horas. Tomar muestras a intervalos regulares. Temperatura: ambiente Solvente: agua:Acetonitrilo (co-solvente) 1:1v/v% Suspensiones Duración máxima: 5 días</p>
<p>Metales pesados</p> <p><u>Condiciones experimentales típicas:</u></p> <p>Fenton (sales de Fe²⁺/Fe³⁺ H₂O₂) Sales empleadas: FeSO₄ o FeCl₂ o FeCl₃ Concentración de metal: 1-5 mM Relación sal: H₂O₂: 1:5-10 Duración máxima: 1 día.</p>
<p>Radicales iniciadores de cadena (AIBN y ACVA)</p> <p><u>Condiciones experimentales típicas:</u></p> <p>AIBN o ACVA Concentración de iniciador: 5-20% de la concentración de API Solvente: Acetonitrilo/agua Temperatura: ambiente a 60°C Duración máxima: 14 días</p>

Análisis de pureza espectral

El análisis de la pureza espectral de los picos cromatográficos (utilizando detectores PDA), puede ser útil para demostrar ausencia o presencia de co-elusión entre las impurezas y el principio activo. Para demostrar pureza espectral (homogeneidad espectral) de un pico cromatográfico, se requiere que el valor de Purity Threshold sea mayor al valor de Purity Angle.

Limitaciones del análisis de pureza espectral

Si el principio activo tiene un espectro UV igual o similar al espectro de las impurezas, el método no es adecuado para determinar homogeneidad espectral.



Si la impureza se encuentra en pequeñas concentraciones el método puede no ser adecuado para determinar pureza espectral.

Siempre que se requiera obtener resultados de pureza espectral, es importante verificar que la absorbancia de los picos en el Max Plot sea menor a 1,0 UA (unidades de absorbancia).

Reporte de especificidad El informe de validación debe incluir:

Cromatogramas representativos: reportar los cromatogramas de los ensayos de interferencia y degradaciones forzadas (si aplica); en una escala adecuada para observar las principales impurezas. La escala debe ser seleccionada en función de los niveles de degradación observados y, siempre que sea posible, todas las muestras deben ser reportadas en la misma escala. Si es necesario puede incluirse una ampliación de algunas zonas específicas del cromatograma, para facilitar la visualización de los picos. Los cromatogramas deben ser perfectamente legibles y nítidos como para poder ser escaneados en el caso de ser necesario.

Tabla de resultados: Reportar en forma tabular los porcentajes de degradación alcanzados y los porcentajes de las principales impurezas de degradación, estableciendo el TR y/o TRR. Los valores de purity angle y purity threshold para el pico mayoritario pueden ser informados (si corresponde).

Criterios de aceptación sugeridos para especificidad según tipo de método:

Métodos Cromatográficos (HPLC/GC): no se deben observar picos (provenientes de los excipientes o del disolvente de muestra) al tiempo de retención de los analitos (Api y/o impurezas). El tiempo de retención del pico principal en la solución de referencia y el pico principal en la solución de muestra se corresponden (se recomienda una ventana de $\pm 5\%$). El método cromatográfico debe lograr la separación de las impurezas del pico principal, no obstante en los casos donde esto es técnicamente imposible y las impurezas están disponibles, la relevancia de la interferencia debería ser demostrada fortificando producto con las impurezas en la concentración límite y comparando los cromatogramas de las muestras fortificadas y no fortificadas. El título de la muestra fortificada debe estar dentro de $\pm 1\%$ respecto de la muestra no fortificada.

Métodos de UV: La solución de muestra exhibe los mismos máximos y/o curva espectral que la solución de referencia. Los excipientes y el disolvente de muestra no presentan máximos de absorción que interfieran con el analito.

Métodos de IR: Identificar los picos en el espectro de la sustancia de referencia. No se observa interferencia de los excipientes o de compuestos estructuralmente relacionados en la muestra para los picos identificados en el espectro de la sustancia de referencia.

Cromatografía en placa delgada (TLC): No se observa interferencia de las manchas correspondientes a los excipientes y a los compuestos estructuralmente relacionados al Rf correspondiente al API. La muestra exhibe una banda correspondiente a la posición de la principal banda obtenida con la solución de referencia.



Métodos de Rotación Óptica: El valor de rotación óptica obtenido a partir de la solución de muestra de compuestos ópticamente activos es similar al valor de rotación óptica de la solución de referencia.

Exactitud

Será evaluada realizando un mínimo de 9 determinaciones sobre un mínimo de 3 niveles de concentración, cubriendo el rango especificado (por ej. 3 concentraciones y 3 réplicas de cada concentración para el procedimiento analítico completo; idealmente, a la concentración más baja representada por el LOQ, media (100%) y más alta del rango evaluado).

Para la determinación de exactitud debe usarse la propuesta más conveniente, de acuerdo al método analítico en estudio:

Valoración API:

Aplicando el método propuesto usando una sustancia con pureza conocida (estándar de referencia) o comparando los resultados obtenidos con aquellos provenientes de un segundo método validado cuya exactitud ha sido establecida.

Valoración Producto terminado:

Aplicando el método analítico propuesto sobre mezclas sintéticas de excipientes fortificadas con cantidades conocidas del analito en niveles por encima y por debajo de la concentración nominal (target). La exactitud se informa como porcentaje de analito recuperado.

Si para el ensayo no hay disponibles muestras con todos los componentes de la formulación, el análisis se puede llevar a cabo mediante el método de adición estándar, en el cuál cantidades de éste son agregados a la solución de producto final o comparar los resultados obtenidos con aquellos de un segundo método validado.

Cuantificación de Impurezas:

Aplicando el método de adición estándar en el cuál cantidades conocidas de impurezas o productos de degradación son agregados a la muestra (API o producto terminado).

Si para el ensayo no hay disponibles muestras de producto con ciertas cantidades de impurezas o productos de degradación, el análisis se puede llevar a cabo mediante la comparación de los resultados obtenidos con aquellos de un segundo método validado; usando el factor de respuesta relativo al API.

Para impurezas desconocidas, la exactitud se puede evaluar mediante la comparación de la respuesta de estándar de API o de una impureza conocida, de acuerdo al método propuesto, dentro de un rango que incluya el rango de trabajo del método, considerando proveer el mismo factor de respuesta.

La Exactitud es calculada mediante la relación del porcentaje de recuperación de un analito, de concentración conocida, añadido a la muestra o mediante la relación entre la concentración determinada experimentalmente, y la concentración teórica correspondiente (valor verdadero aceptado); mediante las siguientes formulas:



$$- \text{Recuperación: } \frac{\text{Concentración Experimental}}{\text{Concentración Teórica}} \times 100 \%$$

o

$$- \text{Recuperación: } \frac{CA (\text{muestra fortificada}) - CA (\text{muestra})}{CTA} \times 100 \%$$

Donde:

- CA es la concentración experimental del analito y CTA es la concentración teórica de analito añadido.

Los rangos y criterios de aceptación sugeridos para cada tipo de método analítico se detallan en el **ANEXO I**.

Precisión

La precisión de un método analítico se determina analizando un determinado número de muestras obtenidas a partir de un material homogéneo. Cada muestra debe ser sometida al procedimiento analítico completo, desde la preparación de la muestra hasta el resultado final.

La precisión se expresa, generalmente, en términos de desviación estándar (S) o la desviación estándar relativa (RSD%), calculadas según las siguientes ecuaciones:

$$S: \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n-1}} \quad \bar{X}: \frac{\sum_{i=1}^n X_i}{n} \quad RSD\%: \frac{S \times 100}{\bar{X}}$$

Donde,

n: número de medidas.

X_i : Valor medido.

\bar{X} : Valor promedio.

Siempre que sea posible, la precisión debe ser determinada usando muestras reales homogéneas. Si no es posible obtener muestras reales, la precisión puede ser determinada usando muestras sintéticas preparadas en el laboratorio.

Niveles de Precisión

La precisión puede ser considerada en 3 niveles:

Repetibilidad (intra-ensayo), Precisión intermedia (dentro del laboratorio) y/o Reproducibilidad (entre laboratorios).



Repetibilidad: Los resultados deben ser obtenidos en las mismas condiciones operativas, con el mismo operario e instrumento.

La Repetibilidad debe ser establecida sobre una muestra homogénea mediante alguna de las siguientes estrategias:

Análisis de 6 preparaciones individuales al 100% de la concentración de análisis.

Análisis de al menos 9 preparaciones individuales cubriendo el rango especificado por el procedimiento (por ej, 3 niveles de concentración con 3 réplicas cada uno).

Precisión intermedia: El estudio de precisión intermedia evalúa las variaciones obtenidas dentro de un mismo laboratorio y puede ser realizada dentro de una misma área (desarrollo analítico) o en dos áreas diferentes (co-validación entre desarrollo analítico y control de calidad). La precisión intermedia involucra la realización del análisis de las muestras siguiendo el mismo procedimiento utilizado en el ensayo de Repetibilidad (por ej.: análisis de 6 muestras al 100%) pero realizado por diferentes analistas, equipos y columnas (siempre que sea posible).

Además, siempre que sea posible, la precisión intermedia y la repetibilidad deben ser realizados en diferentes fechas y el lapso entre ellos va a depender de la sustancia con la que se está trabajando, es decir, que para definirlo se debe contemplar las características fisicoquímicas de dicha sustancia como también la determinación a realizar. Por ejemplo, en el caso de que la sustancia sea altamente higroscópica y se deba determinar su humedad, se recomienda realizar ambos ensayos el mismo día.

En el caso que analistas de control de calidad realicen algún ensayo de validación (Precisión Intermedia), dicho analista debe tener experiencia previa en el manejo del instrumental involucrado y debe estar entrenado en el presente procedimiento. Si los resultados obtenidos entre ambas áreas (control de calidad y desarrollo analítico) cumplen los criterios de aceptación, el método puede ser considerado transferido al área de control de calidad.

Los criterios de aceptación sugeridos para cada tipo de método analítico se detallan en el **ANEXO I**.

Reproducibilidad: La reproducibilidad es la repetición de la precisión intermedia o de la Repetibilidad por un segundo laboratorio independiente. La Reproducibilidad puede ser usada para estudios de precisión inter laboratorio para asegurar que un segundo laboratorio tenga la capacidad de realizar exactamente el mismo método. Los criterios de aceptación deberán ser definidos y justificados de acuerdo al propósito del método, variabilidad intrínseca del método, concentración de trabajo y del analito en la muestra.



Linealidad

Para la evaluación de la linealidad se deben preparar y analizar al menos 5 soluciones de estándar de referencia (principio activo o impurezas) a diferentes niveles de concentración, distribuidos en el rango de medición del método. El rango de medición del método es establecido en función del tipo de procedimiento (título, pureza, disolución). Los rangos mínimos se detallan dentro del parámetro “Rango” (punto 8.4.5). Los rangos y los criterios de aceptación sugeridos según tipo de método analítico se detallan en el **ANEXO I**.

En algunos casos, para obtener la proporcionalidad entre el resultado del análisis y la concentración de la muestra, los datos de la prueba pueden tener que someterse a una transformación matemática antes del análisis de regresión.

Análisis de datos de Linealidad

El tratamiento de los datos de linealidad es normalmente realizado mediante el cálculo de la recta de regresión, por el método de cuadrados mínimos. Se debe graficar la respuesta del equipo vs concentración utilizando el software Empower (para HPLC) u otro software adecuado para el manejo de datos. El análisis de regresión debe realizarse sin forzar la línea de regresión a pasar por el origen.

Se debe calcular la pendiente de la línea de regresión y la ordenada al origen. El valor de la ordenada al origen no debe ser significativamente distinto de cero. Para evaluar este punto se debe calcular el % de intersección con el eje Y utilizando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ intersección} = \frac{\text{Valor de intersección con eje Y}}{\text{Valor de Y al 100\%}} \times 100$$

Donde:

- Valor de intersección con el eje Y: valor de la ordenada al origen de la recta de regresión.
- Valor Y al 100%: Respuesta obtenida a la concentración nominal (target) de la muestra.

Reporte de Linealidad

En el reporte de validación, se debe incluir el gráfico de linealidad. Se debe informar al menos la ecuación de la recta, el coeficiente de correlación (r), la ordenada al origen (b), la pendiente (m), la suma del cuadrado de los residuales y el % de intersección con el eje Y. La ecuación de la recta ($y = m \cdot x + b$) y el coeficiente de correlación (r) pueden ser informados en el mismo gráfico.

Factor de Respuesta Relativo (FRR)

El FRR se debe determinar en métodos de pureza, para cada impureza a cuantificar (siempre que se encuentre disponible). Para determinar el FRR se deben analizar al menos 5 niveles de concentración de cada compuesto relacionado y del principio activo en el rango de



medición del método, debiéndose obtener como mínimo un coeficiente de correlación (r) no menor a 0,99 en cada una de las curvas.

Se debe graficar la respuesta instrumental (área del pico) vs la concentración y calcular el valor de la pendiente de la recta de ajuste.

El FRR se define como la relación de las pendientes entre una impureza determinada y el principio activo, según la siguiente ecuación:

$$\text{FRR} = \frac{\text{Pendiente del principio activo}}{\text{Pendiente de la impureza}} \times 100$$

Donde:

- Pendiente del principio activo: Pendiente del principio activo.
- Pendiente de la impureza: Pendiente de cada uno de los compuestos relacionados.

Los valores de FRR que se encuentran entre 0,8 y 1,2 generalmente son considerados como 1,0. Si durante la validación del método se detecta la necesidad de utilizar el valor exacto de FRR (aun cuando se encuentre entre 0,8 y 1,2) los valores de FRR deben ser incorporados en el método y utilizados en el cálculo de las impurezas. Los valores de FRR que están fuera del rango 0,8 a 1,2, siempre deben ser detallados en la técnica analítica y utilizados en el cálculo de las impurezas.

Rango

Se establece mediante la confirmación de que el procedimiento analítico proporciona un grado aceptable de Linealidad, Exactitud y Precisión cuando se aplica a muestras que contienen cantidades de analito dentro o en los extremos del rango especificado del procedimiento analítico. Normalmente se toman los valores extremos donde los ensayos de linealidad, exactitud y precisión cumplieron las especificaciones establecidas y se expresa en las mismas unidades que se expresa el resultado del análisis (por ejemplo: %p/p, ppm, etc.).

Los rangos de medición sugeridos para cada tipo de método en particular se detallan en el **ANEXO I**.

Rangos Mínimos Según Metodología a Validar

Los siguientes rangos mínimos deben ser considerados:

Título de Principios Activos y Productos: Entre 80% y 120% de la concentración nominal (target) de la muestra.

Uniformidad de contenido: Entre 70% y 130% de la concentración nominal de la muestra, a menos que un rango más amplio sea apropiado, basado en la naturaleza de la forma de dosificación (por ejemplo, inhaladores de dosis medida).

Ensayos de disolución: +/- 20% del intervalo especificado; por ejemplo, si las especificaciones para un producto de liberación controlada cubren una región de 20%,



después de 1 hora, hasta 90%, después de 24 horas, el rango validado sería 0-110% de la cantidad declarada.

Determinación de impurezas: desde el límite de reporte (o LOQ) al 120% de la especificación. Para las impurezas que se conoce que son inusualmente potente o pueden producir efectos farmacológicos tóxicos o inesperados, el límite de detección/cuantificación deben ser proporcionales al nivel en el que las impurezas deben ser controlados.

Título y Pureza: Si el título y la pureza de una muestra se realizan juntos, y sólo se utiliza un estándar al 100%, la linealidad debe cubrir el rango desde el nivel de reporte al 120% de la especificación.

Límite de detección (LOD) y Límite de cuantificación (LOQ)

El límite de detección (LOD) y el límite de cuantificación (LOQ) deben ser determinados y verificados durante la validación de métodos de impurezas (Solventes residuales o sustancias relacionadas).

El límite de cuantificación no debe ser mayor al límite de reporte establecido en el método analítico, teniendo en cuenta la máxima ingesta diaria del producto; según ICH Q3A para principios activos (**Tabla 8**) o según ICH Q3B para productos (**Tabla 9**). **Tabla N° 8:** Límites de Reporte de Impurezas en Principios Activos (ICH Q3A)

Dosis Diaria Máxima	Límite de Reporte (%)
≤ 2 g por día	0,05%
>2 g por día	0,03%

Tabla N° 9: Límites de Reporte de Impurezas en Productos (ICH Q3A)

Dosis Diaria Máxima	Límite de Reporte (%)
≤ 1 g por día	0,1%
> 1 g por día	0,05%

Determinación

La determinación del LOD y LOQ varían según el procedimiento sea instrumental o no instrumental.

Determinación LOD/LOQ instrumental

Basado en la relación Señal/Ruido

Puede ser utilizado cuando el método presenta ruido de línea de base. Se basa en la determinación de la relación señal/ruido (S/R) de la respuesta correspondiente al analito. La determinación de la relación S/R generalmente se realiza en forma manual, utilizando la



ecuación descripta en USP <621> ($S/N = 2 \times H / h$, donde H es la altura del pico del analito y h en el ancho del ruido). Normalmente se establece el LOD instrumental del método con una Relación S/R = 2:1 o 3:1 y el LOQ instrumental con una relación S/R = 10:1.

Basado en la desviación estándar de la respuesta y de la Pendiente

El límite de cuantificación (LOQ) y el LOD pueden calcularse a partir de las siguientes ecuaciones:

$$\text{LOD: } \frac{3,3 \times Sa}{b} \qquad \text{LOQ: } \frac{10 \times Sa}{b}$$

Donde:

b = es la pendiente de la curva de calibración y puede estimarse a partir de ella.

Sa= es la desviación estándar de la respuesta. La estimación puede llevarse a cabo de diversas formas, por ejemplo:

Según desviación estándar del blanco

Se realiza la medición de la magnitud de la respuesta analítica del blanco de medición.

Se realiza mediante el análisis de un número apropiado de muestras de blanco y se calcula la desviación estándar de estas respuestas.

Según la curva de calibración

Una curva de calibración específica debe ser realizada utilizando muestras que contiene el analito en el rango del LOD o LOQ. La desviación estándar residual de la línea de regresión o la desviación estándar de la intersección con el eje Y pueden usarse como la desviación estándar.

Determinación LOD/LOQ en métodos no instrumentales

Por inspección visual: Se analizan muestras adecuadamente diluidas, con concentraciones conocidas del analito y estableciendo el nivel mínimo en el cual el analito puede detectarse/cuantificarse con confiabilidad.

Consideraciones prácticas

Límite de Cuantificación Práctico (PLOQ): Si bien los límites de detección y cuantificación instrumental son expresados en términos de 3 y 10 veces el nivel de ruido, respectivamente, este concepto no resulta muy práctico. El nivel de ruido y la señal de un detector pueden variar cuando las muestras se analizan con detectores de diferentes marcas, o se usan diferentes lotes o marcas de solventes utilizados en las fases móviles, diferentes preparaciones de fase móvil, etc. Por este motivo, se introduce el concepto de **límite de cuantificación práctico (PLOQ)**; el cual se define de la siguiente manera: “*El límite de Cuantificación Práctico es la menor concentración de analito que puede ser cuantificada con precisión y exactitud aceptable en el laboratorio, independientemente de la*



variabilidad normal de la respuesta. La concentración del PLOQ es establecida por el laboratorio en función del alcance del método y del objetivo de la determinación, debiéndose cumplir que la relación señal/ruido obtenida no debe ser menor 10. El PLOQ establecido por el laboratorio en ningún caso puede ser mayor al límite de reporte establecido en el método analítico”.

Límite de Detección Práctico (PLOD): se define al valor de 1/3 del límite de cuantificación práctico PLOQ.

Solución de Sensibilidad: El uso de un estándar de concentración cercana o igual al límite de cuantificación práctico (propuesto por el laboratorio que desarrolla el método) garantiza que una determinada impureza (sustancia relacionada o solvente residual) pueda ser cuantificada a ese nivel, independientemente de la variabilidad normal de la respuesta. Un criterio de aceptación frecuentemente utilizado para la solución de sensibilidad es obtener una relación señal/ruido mayor o igual a 10.

Si el estándar de referencia del compuesto de interés está disponible, una solución de concentración cercana al PLOQ podría ser utilizado. Cuando no se dispone de los estándares del analito, se recomienda utilizar una solución estándar de referencia del principio activo diluidas al nivel del PLOQ. La concentración de la solución de sensibilidad detallada en el método analítico no puede ser superior al Límite de reporte establecido para un determinado analito.

Verificaciones de LOQ y LOD:

Verificación del LOD/PLOD: Una vez que el LOD o PLOD fue determinado por alguno de los métodos detallados anteriormente (por ej., $S/R = 3$), el valor debe ser verificado realizando 3 inyecciones de una solución en la concentración del LOD/PLOD, las cuales deben cumplir las especificaciones (por ej $S/R = 3$).

Verificación del LOQ/PLOQ: Una vez que el LOQ o PLOQ de un analito fue determinado o establecido por alguno de los métodos detallados anteriormente (por ej., a partir de la relación $S/R \geq 10$), el valor debe ser verificado preparando 6 réplicas de las soluciones y determinando el valor de RSD% de las respuesta del analito (por ejemplo: áreas o relación de áreas en métodos con estándar interno) o de los resultados de la cuantificación (por ejemplo: ppm, %p/p, % de recuperación). Si bien, una $RSD\%(n=6) \leq 25\%$ al nivel del LOQ puede ser aceptable, los criterios de aceptación sugeridos para cada tipo de método analítico se detallan en el **ANEXO I**.

Cuando el laboratorio defina una concentración establecida como PLOQ en función del alcance del método, la verificación puede ser realizada al nivel del PLOQ, no siendo necesario realizar la verificación del LOQ instrumental ($S/N = 10$). El valor de PLOD puede ser estimado como 1/3 del valor de PLOQ y verificado a ese nivel. El valor de PLOQ verificado no podrá ser mayor al límite de reporte establecido en el método.



Reporte de LOD y LOQ: Generalmente, LOD/PLOD, LOQ/PLOQ se expresan como concentración del analito (por ejemplo como partes del millón, como porcentaje, etc.) en la muestra. En el reporte final se deben presentar los cromatogramas típicos obtenidos durante la verificación al nivel del LOQ/PLOQ y del LOD/PLOD verificados, en escalas adecuadas para permitir la evaluación del cromatograma.

Robustez

Cambio de parámetros

Las determinaciones analíticas pueden ser susceptibles a las variaciones en las condiciones experimentales. A continuación, se detalla un listado de algunos de los parámetros que más comúnmente se evalúan:

pH del buffer: $\pm 0,2$ unidades (HPLC).

Composición de la fase móvil: $\pm 2\%$ (normalmente para componentes minoritarios de la Fase móvil) para modo isocrático, o pendiente de gradiente: $\pm 2\%$ (para Fase móvil a todos los tiempos) para modo gradiente (HPLC).

Concentración del buffer: $\pm 10\%$ (HPLC).

Temperatura de la columna: $\pm 5^{\circ}\text{C}$ (HPLC, GC).

Velocidad de Flujo: $\pm 10\%$ (HPLC, GC).

Cambio de columna: otra marca pero con características similares (HPLC, GC).

Si la variación de un parámetro del método no cumple los criterios de aceptación establecidos en el protocolo de validación, se debe repetir el ensayo realizando variaciones de menor magnitud, para establecer en que rango el método es robusto (siempre que esto sea posible). Si se establece que la variabilidad de dicho parámetro presenta un alto riesgo de producir fallas (parámetro crítico), este parámetro debe ser identificado en el método analítico y adecuadamente controlado (se debe detallar en el método la estrategia de control aplicada a ese parámetro).

El impacto de los cambios en los parámetros sobre los atributos críticos del método (system suitability) debe ser evaluado durante el estudio de robustez y de ser necesario debe ser actualizado en el método analítico.

Documentación: El protocolo debe establecer claramente que el propósito del ensayo de robustez es determinar las condiciones analíticas bajo las cuales la adecuabilidad del método está controlada e incluir los criterios de aceptación adecuados. Además el protocolo debe establecer que no se debe realizar ninguna investigación o desvío por resultado fuera de especificaciones si al realizar cambios deliberadamente se determina que el método no cumple con los criterios de aceptación establecidos.



Reporte: Se puede informar % de Recuperación o Diferencia Porcentual.

En el caso de informar Diferencia porcentual relativa ($Dif_{(%)}$) de los resultados obtenidos con las diferentes condiciones, se deben calcular con la siguiente ecuación:

$$\text{Diferencia relativa porcentual} = \frac{|\text{valor de Condición normal} - \text{valor con la condición cambiada}|}{\text{Valor de Condición normal}} \times 100$$

Valor de Condición normal

Estabilidad de las soluciones

Consideraciones Generales

Siempre que sea posible, los estudios de estabilidad deben ser realizados en las condiciones normales de temperatura y humedad de laboratorio. Cuando las soluciones no son estables en las condiciones normales de laboratorio, se debe estudiar la estabilidad en heladera (2-8 °C) y/o en freezer (pueden ser realizados simultáneamente).

Se recomienda realizar el estudio de estabilidad entre 3 y 7 días, tomando muestras a intervalos regulares de tiempo, realizando el análisis contra la solución estándar recientemente preparada en el análisis final del estudio de estabilidad si es apropiado.

Para sustancias sensibles a la luz, el almacenamiento durante el estudio de estabilidad debe ser realizado con las soluciones protegidas de la luz.

Las soluciones de estándar y muestra deben ser estables durante el tiempo que dura el análisis, por lo que soluciones envejecidas deben ser analizadas contra soluciones recientemente preparadas y la diferencia relativa entre ambas soluciones debe cumplir el criterio de aceptación establecido.

Alternativamente, se puede determinar el área, % de área de inyecciones, o título del pico principal o de las impurezas, realizadas a cada tiempo de estabilidad y evaluar la diferencia porcentual respecto del tiempo inicial.

Reporte: Se debe calcular la diferencia porcentual ($Dif_{(%)}$) o el % de recuperación entre los resultados iniciales y los resultados obtenidos a cada tiempo.

En el caso de informar Diferencia porcentual relativa ($Dif_{(%)}$) de los resultados obtenidos, se deben calcular con la siguiente ecuación:

$$\text{Diferencia porcentual relativa (Dif}_{(}\%) = \frac{|\text{Valor tiempo}_{\text{inicial}} - \text{Valor tiempo}_n|}{\text{Valor tiempo}_{\text{inicial}}} \times 100$$

Documentación: El protocolo debe establecer claramente que el propósito del estudio de estabilidad es establecer el tiempo máximo que las soluciones pueden ser utilizadas en condiciones de rutina del laboratorio (por ejemplo, cubriendo el tiempo de un fin de semana). Si las soluciones no demuestran ser estables en todo el periodo estudiado, no implica investigaciones o desvíos. Los resultados de estabilidad de la muestra deben ser incorporados en el método analítico luego de aprobado el informe de validación.



Criterios para la selección de muestras de API para Validación de Métodos Analíticos

Se recomienda el uso de APIs sintetizados al menos con equipamiento de escala piloto, empleando un proceso de manufactura comparable al proceso de manufactura comercial.

Para las validaciones y/o verificaciones puede utilizarse un lote de API vencido o fuera de especificaciones siempre y cuando sea adecuado para el uso propuesto.

Criterios para la selección de muestras de producto para Validación de Métodos Analíticos

Se recomienda que las muestras sean preparadas al menos con equipamiento de escala piloto usando procesos de manufactura comparables con los procesos de manufactura comercial.

Lo ideal es usar un lote normal, común o corriente de producto, dentro de lo posible que esté vencido que no esté destinado a distribución comercial. Puede utilizarse unidades descartadas de producción, tales como puntos negros, envases con desperfectos físicos, etc., siempre que el motivo de descarte no involucre al parámetro a validar (Por ej., no usar descartes mal dosificados en análisis de Valoración o uniformidad de contenido).

En el caso que existan varias dosis cuyas fórmulas cuantitativas sean proporcionales, se puede seleccionar la dosis más alta y la más baja como soporte para todas las dosis (Bracketing).

En el caso que todas las dosis se preparen de manera tal que todas las soluciones de muestra posean la misma concentración (y la misma composición cuali-cuantitativa), se puede usar cualquiera de las dosis para realizar los ensayos de validación.

Requerimientos de calidad de Estándares para usos en Validaciones de Métodos Analíticos:

El material estándar utilizado en validaciones de métodos analíticos con fines cuantitativos ya sea adquirido comercialmente, elaborado y/o estandarizado "In House" S.A; deberá cumplir mínimamente con los criterios de calidad cuantitativa pre-establecidos

Manejo y conservación de muestras para Validación de Métodos Analíticos

Para Productos/Sustancias comerciales

Las muestras se deben conservar y manipular respetando las condiciones establecidas por el fabricante.

Para diferentes validaciones se deben tomar muestras por separado, siempre que sea posible.

Se debe tener especial cuidado en las muestras para validaciones de Karl Fischer dado que se debe evitar que adquieran humedad del ambiente.

Para Productos/Sustancias No comerciales

Se deben tener en cuenta los siguientes aspectos:

Tipo y cantidad de recipientes: Al momento de la toma de la muestra a utilizar en validación o cuando se prepara un pool de muestras de producto terminado, se debe evaluar el/los recipiente/s a utilizar para la conservación de la misma, de acuerdo a las características fisicoquímicas y microbiológicas de la sustancia.

Como regla general, los recipientes deben ser herméticos.

UCSF

Universidad Católica
de Santa Fe

Farmacia



Facultad de Ciencias de la Salud

Se debe tener en cuenta si es necesario que la muestra se almacene bajo Nitrógeno o algún gas inerte (en caso que se oxide rápidamente) o si es sensible a la luz.

Se debe tener en cuenta el analito cuya determinación se está por validar (si el analito es agua, se debe extremar cuidados respecto a la hermeticidad del recipiente para evitar que la muestra se humecte).

Se debe evaluar si es necesario tomar la muestra en más de un recipiente por validación (por ej., si es necesario tomar muestra para exactitud y precisión por separado), para evitar una excesiva manipulación del material.

Las consideraciones necesarias sobre el recipiente y las condiciones de almacenamiento de las muestras deben incluirse en los protocolo de validación y/o verificación.

Condiciones de conservación

Las condiciones de conservación de la muestra se deben incluir en el protocolo de validación, en el ítem “Condiciones de conservación”.

Rótulo: Las muestras de validación deben poseer un rótulo que posea la siguiente información mínima: Nombre de la sustancia, Lote, Fecha de caducidad, Para uso en: (referir a la validación en la que se va a utilizar y/o parámetro a determinar), Condiciones de conservación.

Desvíos en la validación

Durante la validación y/o verificación de un método analítico, cualquier desvío debe ser investigado y reportado haciendo uso de los procedimientos vigentes para documentar desviaciones.

Documentación

Protocolos de Verificación y/o validación:

Antes de iniciar el trabajo experimental de una validación o verificación de un método analítico se debe escribir y aprobar el protocolo, cuya finalidad es documentar los pasos requeridos para verificar/validar el método y especificar los criterios de aceptación.

Antes del inicio de la verificación o validación, todo el personal involucrado en el estudio debe leer y asegurarse de comprender el protocolo y la técnica a validar.

Los criterios de aceptación del protocolo pueden diferir de lo establecido en el presente POE, siempre y cuando se presente una justificación adecuada.

De ser necesario, pueden prepararse hojas de datos para el registro del Raw Data y para el análisis estadístico, a fin de documentar completamente el trabajo de verificación.

Informe de validación/verificación

Posteriormente a la ejecución de los ensayos descritos en el protocolo de validación/verificación, se debe documentar los resultados en un informe de validación/verificación.

Para cada parámetro de verificación/validación, se debe especificar si el resultado cumple las especificaciones e informar los resultados obtenidos. Incluir todos los gráficos, cromatogramas o espectros representativos de los ensayos (especificidad, LOQ/LOD, robustez si corresponde).



Informe Preliminar de Validación de Métodos Analíticos

Un informe preliminar de validación de métodos analíticos puede ser preparado, revisado y aprobado después de que algunos de los parámetros de validación de método hayan sido realizados para la liberación del método (ver Tabla 4 y requerimientos mínimos de validación en el punto 8.2.4).

Archivo de la documentación generada en las Validaciones y/o Verificaciones:

Todos los protocolos e informes de validación de métodos analíticos, verificación de métodos compendiados y sus correspondientes datos de soporte, quedarán archivados bajo la responsabilidad de Desarrollo Analítico.

El reporte de Validación y/o Verificación incluirá una tabla describiendo la ruta de acceso a la información, ya sean de los datos crudos en los cuadernos de los analistas (Nº de cuaderno/s, analista/s, páginas), como así también la ruta de los registros electrónicos generados en el software de los equipos que así lo permitieren (Proyectos, Carpetas, Subcarpetas, registros electrónicos). **Ver ANEXO II.**

Cambio y modificaciones durante la validación/verificación

Modificaciones del System suitability (Adecuabilidad del Sistema)

Los parámetros de adecuabilidad del sistema deben ser inicialmente establecidos en el protocolo de validación/verificación del método y en el método. La performance del método y el cumplimiento del system suitability deben ser evaluados durante la validación. Cuando sea necesario implementar cambios, en función de los resultados obtenidos durante la validación, éstos deberán ser justificados y documentados en el reporte de validación y en el método analítico.

Modificaciones del Método

Las condiciones del método pueden ser modificadas/optimizadas para lograr ser adecuadas para el uso propuesto. Cuando sea necesario modificar el método durante la validación, se debe justificar el cambio y validar el método teniendo en cuenta las modificaciones realizadas. El cambio debe ser aprobado por el líder analítico del proyecto y se debe documentar en el reporte de validación y en el método analítico.

Diseño experimental y criterio de aceptación

El diseño experimental y los criterios de aceptación deben ser predeterminados en el protocolo de validación. El diseño experimental y los criterios de aceptación pueden ser cambiados siempre y cuando el cambio sea justificado científicamente. El cambio será actualizado en el protocolo de validación.



ANEXO I

Diseño Experimental Modelo y Criterios de Aceptación Orientativos de Métodos Analíticos

Tabla 1: Validación de método de Valoración de principios activos u otros analitos¹.

Elementos de Validación	Diseño experimental	Criterio de aceptación ²
Adecuación del Sistema (System suitability)	Analizar el system suitability bajo las condiciones de la metodología analítica.	Cumplir criterio de system suitability o hacer la justificación necesaria.
Especificidad-Interferencia	Analizar el diluyente y otras fuentes de interferencia si corresponde. Analizar la solución de selectividad (la muestra fortificada con impurezas conocidas al nivel del 1%)	No se observan interferencias del disolvente con el/los analito/s de interés.
Estudios de degradación forzada	<p><u>Condición de degradación de referencia:</u> entre 5% - 20% del componente principal.</p> <ul style="list-style-type: none"> - Si no es posible lograr el 5% de degradación bajo las condiciones máximas, no son requeridos estudios de estrés adicionales y se agregará una justificación científica. - Si se obtienen degradaciones mayores al 20 %, se deberán ensayar condiciones más suaves o tiempos más cortos. <p><u>Condiciones de referencia:</u></p> <ol style="list-style-type: none"> (1) 80°C, 1 semana (5-7 días) (2) UV (200 Wh/m²) y luz blanca (1,2 millones lux horas)³ (3) HCl 0,1N, temperatura ambiente, 24 hs + neutralización (NaOH 0,1N) (4) NaOH 0,1N, temperatura ambiente, 24 hs + neutralización (HCl 0,1N) (5) H₂O₂ al 3%, temperatura ambiente, 24 hs (puede llevarse a cabo separadamente un estudio de oxidación adicional con AIBN). <p>Controlar la pureza del pico principal si corresponde, por ejemplo, con detector de arreglo de diodos (PDA), informando Purity Angle, Purity Threshold.</p> <p>Informar la pureza cromatográfica (% área) del componente principal y de cada compuesto relacionado.</p> <p>Para metodologías que analizan en un mismo sistema cromatografico Título y sustancias relacionadas, calcular el Título (%) del componente principal y cuantificar cada compuesto relacionado especificado y no especificado (%p/p, % área) contra una solución de estándar (si corresponde) y calcular el balance de masa; para cada una de las muestras sometidas a degradación forzada y condición normal.</p>	<p>El pico del API es separado de los otros picos, o la interferencia para el API es máx. 0,2 % (absoluto)</p> <ul style="list-style-type: none"> - Evaluar la pureza espectral del pico principal (PDA): P1T > P1A, si aplica.
Linealidad	Preparar soluciones estándares en al menos cinco niveles de concentraciones, cubriendo mínimamente el rango desde 80% hasta no menos del 120% de la concentración objetivo. Realizar el análisis de regresión lineal (respuesta vs concentración) y calcular la pendiente, ordenada al origen, el coeficiente de correlación (r), la intersección con el eje Y (%), y la suma del cuadrado de los residuales	<p>r: Mín. 0,995.</p> <p>r: Mín. 0,990 (para excipientes y conservantes).</p>
Precisión: Repetibilidad	Preparar seis soluciones de muestra al 100% de la concentración objetivo. Calcular el Título individual, Título promedio y la RSD (%), para n = 6.	<u>%RSD</u> : Máx. 2,0% (n=6).



Elementos de Validación	Diseño experimental	Criterio de aceptación ²
Precisión: Precisión intermedia	Un segundo analista repetirá el ensayo de Repetibilidad, en un día diferente, usando un sistema y columna diferente. Calcular el Título individual, el Título promedio y la desviación estándar relativa, para n = 6. Calcular el Título promedio y la desviación estándar relativa, para n = 12. Calcular la diferencia absoluta entre el promedio de los valores de Título de cada analista.	<u>Para cada analista,</u> Ver Repetibilidad <u>Para ambos analistas,</u> %RSD: Máx. 2,0% (n=12) <u>Diferencia entre promedios:</u> Máx. 2,5 % (absoluto).
Exactitud	Preparar tres soluciones muestra al 80% de la concentración objetivo. Preparar tres soluciones muestra al 100% de la concentración objetivo. Preparar tres soluciones muestras al 120% de la concentración objetivo. Informar la recuperación individual, la recuperación promedio y la desviación estándar relativa, a cada nivel.	- %Rec. promedio: 98,0 % - 102,0 %, para n: mín. 9. ² - %RSD: Máx. 2,0 %.
Rango	Se define en el intervalo de concentraciones en el cual linealidad, precisión y exactitud cumplen con el criterio de aceptación.	Mín. 80% - 120%.
Estudio de sesgo del filtro	Evaluar la recuperación entre los resultados de la muestra filtrada y sin filtrar.	- %Rec: Máx. 2,0 % ²
Estabilidad de Solución	<u>Solución estándar y muestra:</u> Preparar las soluciones de acuerdo a la metodología analítica. Ajustar a las condiciones de almacenamiento (envase primario) y temperatura (ambiente, heladera, HPLC, etc). Calcular la recuperación entre los resultados obtenidos (área promedio, título, etc) en cada tiempo de estabilidad (n), con respecto al tiempo inicial.	%Rec: 98,0 % - 102,0 %. ²
Robustez	Condiciones de cambios recomendados: ⁴ 1) <u>pH del buffer:</u> ± 0,2 unidades (HPLC). 2) <u>Composición de la fase móvil:</u> ± 2% (normalmente para componentes minoritarios de la Fase móvil) para modo isocrático, o pendiente de gradiente: ± 2% (para Fase móvil a todos los tiempos) para modo gradiente (HPLC). 3) <u>Concentración del buffer:</u> ± 10% (HPLC). 4) <u>Temperatura de la columna:</u> ± 5°C (HPLC, GC). 5) <u>Velocidad de Flujo:</u> ± 10% (HPLC, GC). 6) <u>Cambio de columna:</u> otra marca, similares características (HPLC, GC). Evaluar la recuperación entre los resultados obtenidos en cada condición de cambio, respecto de la condición normal. Para cada condición de cambio evaluar la solución estándar y la solución muestra si corresponde ⁴	- Cumple con las condiciones del System suitability. - %Rec.: 98,0 % - 102,0 %. ^{2,5}

¹ Los criterios de aceptación de "otros analitos" (tales como excipientes/aditivos) deberían ser diferentes a los de API.

² Los criterios de aceptación de la presente tabla son aplicables para la especificación de Valoración de 98,0% - 102,0%. Los criterios de aceptación deberían ser ajustados acorde en el protocolo de validación del método para la especificación de Valoración de 99,0% - 101,0%.

³ Por ejemplo, UV (200 Wh/m², a 22,5 W/m² por 8,9 h = 200 Wh/m², o a 10 W/m² por 20 h = 200 Wh/m²) y luz blanca (1,2 millones lux horas, a 133 klux por 9 h = 1,2 millones lux horas, o a 55 klux por 21,8 h = 1,2 millones lux horas).

UCSF

Universidad Católica
de Santa Fe

Farmacia



Facultad de Ciencias de la Salud

⁴ Condiciones críticas de los factores del método deberían ser evaluadas en el estudio de robustez y actualizadas en el método. Variaciones de los factores del método deberían ser técnicamente justificables.

⁵ O cumple cualquier otro criterio de los atributos críticos definidos para el método. En caso contrario, las condiciones específicas de robustez deben ser detalladas en el método de análisis.



Tabla 2: Validación de método de Valoración para principio activo y otros analitos¹ en producto terminado

Elementos de Validación	Diseño experimental	Criterio de aceptación ²
Adecuación del Sistema (System suitability)	Analizar el system suitability bajo las condiciones de la metodología analítica.	Cumplir criterio de system suitability o hacer la justificación necesaria
Especificidad-Interferencia	Analizar el diluyente, placebo y otras fuentes de interferencia si corresponde. Analizar la solución de selectividad (la muestra fortificada con impurezas conocidas al nivel del 1%).	No se observan interferencias del disolvente o la matriz con el/los analito/s de interés.
Estudio de degradación forzada	Someter una muestra de producto (o muestra sintética: placebo + API) bajo las condiciones sugeridas. <u>Condición de degradación de referencia:</u> entre 5% - 20% del componente principal. - Si no es posible lograr el 5% de degradación bajo las condiciones máximas, no son requeridos estudios de estrés adicionales y se agregará una justificación científica. - Si se obtienen degradaciones mayores al 20 %, se deberán ensayar condiciones más suaves o tiempos más cortos. <u>Condiciones de referencia:</u> (1) 80°C, 1 semana (5-7 días) (2) UV (200 Wh/m ²) y luz blanca (1,2 millones lux horas) ³ (3) HCl 0,1N, temp. ambiente, 24 hs + neutralización (NaOH 0,1N) (4) NaOH 0,1N, tempe. ambiente, 24 hs + neutralización (HCl 0,1N) (5) H ₂ O ₂ al 3%, temp. ambiente, 24 hs (puede llevarse a cabo separadamente un estudio de oxidación adicional con AIBN). Controlar la pureza del pico principal si corresponde, por ejemplo, con detector de arreglo de diodos (PDA), informando Purity Angle, Purity Threshold. Informar la pureza cromatográfica (% área) del componente principal y de cada compuesto relacionado. Para metodologías que analizan en un mismo sistema cromatografico Título y sustancias relacionadas, calcular el Título (%) del componente principal y cuantificar cada compuesto relacionado especificado y no especificado (%p/p, % área) contra una solución de estándar (si corresponde) y calcular el balance de masa; para cada una de las muestras sometidas a degradación forzada y condición normal.	El pico del API es separado de los otros picos, o la interferencia para el API es máx. 0,5 % (absoluto). - Evaluar la pureza espectral del pico principal (PDA): PIT > P1A, si aplica.
Linealidad	Preparar soluciones estándares en al menos cinco niveles de concentraciones, cubriendo mínimamente el rango desde 80% hasta no menos del 120% de la concentración objetivo. Realizar el análisis de regresión lineal (respuesta vs concentración) y calcular el coeficiente de correlación (r), la intersección con el eje Y (%), la pendiente y la suma del cuadrado de los residuales	r: Mín. 0,995. r: Mín. 0,990 (para excipientes y conservantes).



Elementos de Validación	Diseño experimental	Criterio de aceptación ²
Exactitud	Preparar tres soluciones de muestra (placebo + API) al 80 % de la concentración objetivo. Preparar tres soluciones de muestra (placebo + API) al 100% de la concentración objetivo. Preparar tres soluciones de muestra (placebo + API) al 120% de la concentración objetivo. Calcular la recuperación individual y promedio a cada nivel. Calcular la desviación estándar relativa entre el total de determinaciones n = mín. 9.	- % <u>Rec. promedio</u> : 98,0 % - 102,0 %. - % <u>RSD</u> : Máx. 2,0 %, para n = mín. 9. Para excipientes: 90,0 % – 110,0 %.
Rango	Se define en el intervalo de concentraciones en el cual linealidad, precisión y exactitud cumplen con el criterio de aceptación.	Mín. 80 % - 120 %.
Precisión: Repetibilidad	Preparar seis soluciones de muestra de producto (o muestra sintética: placebo + API), para la dosis más baja y más alta si corresponde. Calcular el Título individual, Título promedio y la desviación estándar relativa, para n = 6.	- % <u>RSD</u> : Máx. 2,0 %. - <u>Para uniformidad de contenido</u> : Máx. 3,0 %. - <u>Para conservantes y excipientes</u> : Máx. 10 %.
Precisión: Precisión intermedia	Un segundo analista repetirá el ensayo de Repetibilidad, en un día diferente, usando un sistema y columna diferente. Calcular el Título individual, el Título promedio y la desviación estándar relativa, para n = 6. Calcular el Título promedio y la desviación estándar relativa, para n = 12. Calcular la diferencia absoluta entre los valores de Título promedio de cada analista.	<u>Para cada analista</u> , Ver Repetibilidad <u>Para ambos analistas</u> , - % <u>RSD</u> : Máx. 3,0 % (n=12) - <u>Uniformidad de contenido</u> : Máx. 5,0 % (n=6), - <u>Conservantes y excipientes</u> : Máx. 20 % - <u>Diferencia entre promedios</u> : Máx. 3,0 % (absoluto).
Estudio de sesgo del filtro	Evaluar la recuperación entre los resultados de la muestra filtrada y sin filtrar.	- % <u>Rec</u> : Máx. 2,0 %
Estabilidad de Solución	<u>Solución estándar y muestra</u> : Preparar las soluciones de acuerdo a la metodología analítica. Ajustar a las condiciones de almacenamiento (envase primario) y temperatura (ambiente, heladera, HPLC, etc). Calcular la recuperación entre los resultados obtenidos (área promedio, título, etc) en cada tiempo de estabilidad (n), con respecto al tiempo inicial.	% <u>Rec</u> : 98,0 % - 102,0 %.



Robustez	<p>Condiciones de cambios recomendados:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) pH del buffer: $\pm 0,2$ unidades (HPLC). 2) <u>Composición de la fase móvil</u>: $\pm 2\%$ (normalmente para componentes minoritarios de la Fase móvil) para modo isocrático, o pendiente de gradiente: $\pm 2\%$ (para Fase móvil a todos los tiempos) para modo gradiente (HPLC). 3) <u>Concentración del buffer</u>: $\pm 10\%$ (HPLC). 4) <u>Temperatura de la columna</u>: $\pm 5^{\circ}\text{C}$ (HPLC, GC). 5) <u>Velocidad de Flujo</u>: $\pm 10\%$ (HPLC, GC). 7) <u>Cambio de columna</u>: otra marca, similares características (HPLC, GC). <p>Evaluar la recuperación entre los resultados obtenidos en cada condición de cambio, respecto de la condición normal. Para cada condición de cambio evaluar la solución estándar y la solución muestra si corresponde⁴</p>	<p>- Cumple con las condiciones del System suitability.</p> <p>- %Rec.: 98,0 % – 102,0 %.⁵</p>
----------	--	---

¹ Los criterios de aceptación de “otros analitos” (tales como excipientes/aditivos) deberían ser diferentes a los de API.

² Los criterios de aceptación de la presente tabla son aplicables para la especificación de Valoración de 90,0% - 110,0%. Los criterios de aceptación deberían ser ajustados acordeamente en el protocolo de validación del método para la especificación de Valoración de 95,0% - 105,0%.

³ Por ejemplo, UV (**200 Wh/m²**, a 22,5 W/m² por 8,9 h = 200 Wh/m², o a 10 W/m² por 20 h = 200 Wh/m²) y luz blanca (**1,2 millones lux horas**, a 133 klux por 9 h = 1,2 millones lux horas, o a 55 klux por 21,8 h = 1,2 millones lux horas).

⁴ Condiciones críticas de los factores del método deberían ser evaluadas en el estudio de robustez y actualizadas en el método. Variaciones de los factores del método deberían ser técnicamente justificables.

⁵ Por ejemplo, utilizando la solución preparada en el parámetro de precisión (la de mayor dosis), el pico del principio activo es separado de los otros picos o la diferencia (Dif_%): máx. 3,0% entre resultados de título bajo las condiciones de robustez vs condiciones normales y cumple con cualquier otro criterio de los atributos críticos definidos para el método.



Tabla 3: Validación de método de determinación de impurezas (cuantitativo) en API.

Elementos de Validación	Diseño experimental	Criterio de aceptación
Adecuación del Sistema (System suitability)	Realizar el system suitability en el método	Cumplir criterio de system suitability o hacer la justificación necesaria
Especificidad-Interferencia	Analizar el diluyente y otras fuentes de interferencia si corresponde. Inyectar la solución estándar de impureza individual para identificación si corresponde	No se observan interferencias del disolvente o las impurezas/productos de degradación con el/los analito/s de interés.
Estudio de degradación forzada	Someter una muestra de producto (o muestra sintética: placebo + API) bajo las condiciones sugeridas. <u>Condición de degradación de referencia:</u> entre 5% - 20% del componente principal. - Si no es posible lograr el 5% de degradación bajo las condiciones máximas, no son requeridos estudios de estrés adicionales y se agregará una justificación científica. - Si se obtienen degradaciones mayores al 20 %, se deberán ensayar condiciones más suaves o tiempos más cortos. <u>Condiciones de referencia:</u> (1) 80 °C, 1 semana (5-7 días). (2) UV (200 Wh/m ²) y luz blanca (1,2 millones lux horas). ¹ (3) HCl 0,1N, temp. ambiente, 24 hs + neutralización (NaOH 0,1N). (4) NaOH 0,1N, temp. ambiente, 24 hs + neutralización (HCl 0,1N). (5) H ₂ O ₂ al 3%, temp. ambiente, 24 hs (puede llevarse a cabo separadamente un estudio de oxidación adicional con AIBN). Controlar la pureza del pico principal si corresponde, por ejemplo, con detector de arreglo de diodos (PDA), informando Purity Angle, Purity Threshold. Informar la pureza cromatográfica (% área) del componente principal y de cada compuesto relacionado. Para metodologías que analizan en un mismo sistema cromatografico Título y sustancias relacionadas, calcular el Título (%) del componente principal y cuantificar cada compuesto relacionado especificado y no especificado (%p/p, % área) contra una solución de estándar (si corresponde) y calcular el balance de masa; para cada una de las muestras sometidas a degradación forzada.	- Cada pico de impureza es separado de los otros picos y del pico del API. - Evaluar la pureza espectral del pico principal (PDA): PIT > P1A, si aplica.
Linealidad	Preparar mezclas de soluciones estándares de API e impurezas en al menos cinco niveles de concentraciones, cubriendo mínimamente el rango desde el límite de cuantificación (LOQ) hasta no menos del 120 % de la concentración objetivo. Realizar el análisis de regresión lineal (respuesta vs concentración) y calcular el coeficiente de correlación (r), la intersección con el	r: Mín. 0,990



Elementos de Validación	Diseño experimental	Criterio de aceptación
	eje Y (%), la pendiente, la suma del cuadrado de los residuales y factores de respuesta relativos (FRR).	
Exactitud	Preparar tres soluciones de muestras conteniendo API, fortificadas con las impurezas conocidas al nivel LOQ. Preparar tres soluciones de muestras conteniendo API, fortificadas con las impurezas conocidas al 100% de la concentración objetivo. Preparar tres soluciones de muestras conteniendo API, fortificadas con las impurezas conocidas al 120% de la concentración objetivo. Preparar una solución muestra conteniendo el principio activo sin fortificar como control blanco. Calcular la recuperación individual, recuperación promedio y la desviación estándar relativa, a cada nivel.	- Recuperación promedio al nivel LOQ: 70,0 % - 130,0 %. - %RSD: Máx. 30,0 % - Recuperación promedio a niveles 100 % y 120 %: 80,0 % - 120,0 %. - %RSD: Máx. 20,0 %
Precisión: Repetibilidad	Preparar seis soluciones de muestras de API fortificadas con impurezas conocidas aproximadamente al 100% de la concentración objetivo. Calcular el promedio (% área, % p/p) y la desviación estándar relativa de cada impureza, para n = 6.	- Nivel LOQ – 0,49 %: %RSD: Máx. 25,0 % (n=6) - Nivel 0,50 – 1,0 %: %RSD: Máx. 20,0 % (n=6) - Nivel > 1,0 %: %RSD: Máx. 15,0 % (n=6)
Precisión: Precisión intermedia	Un segundo analista repetirá el ensayo de Repetibilidad, en lo posible en un día diferente, usando un sistema y columna diferente. Calcular el promedio (% área, % p/p) y la desviación estándar relativa de cada impureza, por cada analista, para n = 6. Calcular el promedio (% área, % p/p) y la desviación estándar relativa de cada impureza, entre los analistas, para n = 12.	<u>Para cada analista,</u> Ver Repetibilidad <u>Para ambos analistas:</u> - Nivel LOQ – 0,50 %: %RSD: Máx. 30,0% (n=12) - Nivel 0,51 – 1,0 %: %RSD: Máx. 25,0% (n=12) - Nivel > 1,0 %: %RSD: Máx. 20,0% (n=12)
Rango	Se define en el intervalo de concentraciones en el cual linealidad, precisión y exactitud cumplen con el criterio de aceptación.	Mínimo LOQ/LOQp - 120 %.
Límite de cuantificación	<u>Exactitud:</u> Preparar tres soluciones mezcla de estándar de API y estándar de impureza al nivel del LOQ/LOQp, en el disolvente. Analizar cada solución una vez.	<u>%Rec.:</u> 70,0 % - 130,0 %
	<u>Precisión:</u> Preparar una solución mezcla de estándar de API y estándar de impureza, al nivel del LOQ/LOQp. Analizar por sextuplicado.	- S/N promedio: Min. 10:1. - RSD (%): Max. 25,0 %.
Límite de detección	Preparar una solución mezcla de estándar de API y estándar de impureza diluyendo a 1/3 la solución preparada al nivel LOQ/LOQp.	- S/N: Min. 2:1 o 3:1



Elementos de Validación	Diseño experimental	Criterio de aceptación
Estudio de sesgo del filtro	Evaluar la recuperación entre los resultados de la muestra filtrada y sin filtrar.	- %Rec.: aplicar los mismos criterios que en el parámetro de exactitud.
Estabilidad de Solución	<u>Solución estándar y muestra</u> : Preparar una solución de estándar y muestra de acuerdo a la metodología analítica. Ajustar a las condiciones de almacenamiento (envase primario) y temperatura (ambiente, heladera, HPLC, etc). Calcular la recuperación entre los resultados obtenidos (% área, % p/p, etc) en cada tiempo de estabilidad (n), con respecto al tiempo inicial.	- %Rec. Estándar: 95,0% - 105,0% (para API) y 90,0%-110,0% (para cada impureza conocida). - %Rec. Muestra: Aplicar los mismos criterios que en el parámetro de exactitud.
Robustez	Condiciones de cambios recomendados ² : (1) <u>pH del buffer</u> : $\pm 0,2$ unidades (HPLC). (2) <u>Composición de la fase móvil</u> : $\pm 2\%$ (normalmente para componentes minoritarios de la Fase móvil) para modo isocrático, o pendiente de gradiente: $\pm 2\%$ (para Fase móvil a todos los tiempos) para modo gradiente (HPLC). (3) <u>Concentración del buffer</u> : $\pm 10\%$ (HPLC). (4) <u>Temperatura de la columna</u> : $\pm 5^{\circ}\text{C}$ (HPLC, GC). (5) <u>Velocidad de Flujo</u> : $\pm 10\%$ (HPLC, GC). (6) <u>Cambio de columna</u> : otra marca, similares características (HPLC, GC).	- Cumple con las condiciones del System suitability. - %Rec.: aplicar los mismos criterios que en el parámetro de exactitud. ³

¹ Por ejemplo, UV (**200 Wh/m²**, a 22,5 W/m² por 8,9 h = 200 Wh/m², o a 10 W/m² por 20 h = 200 Wh/m²) y luz blanca (**1,2 millones lux horas**, a 133 klux por 9 h = 1,2 millones lux horas, o a 55 klux por 21,8 h = 1,2 millones lux horas).

² Condiciones críticas de los factores del método deberían ser evaluadas en el estudio de robustez y actualizadas en el método. Variaciones de los factores del método deberían ser técnicamente justificables.

³ Por ejemplo, utilizando una solución del análisis de precisión, evaluar la recuperación de cada impureza conocida en cada condición de cambio respecto de la condición normal y cumple con cualquier otro criterio de los atributos críticos definidos para el método.



Tabla 4: Validación de método de cuantificación de impurezas en producto terminado

Elementos de Validación	Diseño experimental	Criterio de aceptación
Adecuación del Sistema (System suitability)	Realizar el system suitability de acuerdo a la metodología analítica.	Cumplir criterio de system suitability o hacer la justificación necesaria
Especificidad-Interferencia	Analizar el diluyente, el placebo y otras fuentes de interferencia si corresponde. Inyectar solución estándar de impureza individual para identificación si corresponde.	No se observan interferencias del disolvente con el/los analito/s de interés.
Estudio de degradación forzada	Someter una muestra de producto (o muestra sintética: placebo + API) bajo las condiciones sugeridas. <u>Condición de degradación de referencia:</u> entre 5% - 20% del componente principal. - Si no es posible lograr el 5% de degradación bajo las condiciones máximas, no son requeridos estudios de estrés adicionales y se agregará una justificación científica. - Si se obtienen degradaciones mayores al 20 %, se deberán ensayar condiciones más suaves o tiempos más cortos. <u>Condiciones de referencia:</u> (1) 80°C, 1 semana (5-7 días). (2) UV (200 Wh/m ²) y luz blanca (1,2 millones lux horas). ² (3) HCl 0,1N, temp. ambiente, 24 hs + neutralización (NaOH 0,1N). (4) NaOH 0,1N, temp. ambiente, 24 hs + neutralización (HCl 0,1N) (5) H ₂ O ₂ al 3%, temp. ambiente, 24 hs (puede llevarse a cabo separadamente un estudio de oxidación adicional con AIBN). Controlar la pureza del pico principal si corresponde, por ejemplo, con detector de arreglo de diodos (PDA), informando Purity Angle, Purity Threshold. Informar la pureza cromatográfica (% área) del componente principal y de cada compuesto relacionado. Para metodologías que analizan en un mismo sistema cromatografico Título y sustancias relacionadas, calcular el Título (%) del componente principal y cuantificar cada compuesto relacionado especificado y no especificado (%p/p, % área) contra una solución de estándar (si corresponde) y calcular el balance de masa; para cada una de las muestras sometidas a degradación forzada.	- Cada pico de impureza es separado de los otros picos y del pico del API. - Evaluar la pureza espectral del pico principal (PDA): P1T > P1A, si aplica.
Linealidad	Preparar mezclas de soluciones estándar de API e impurezas como mínimo en cinco niveles de concentraciones, cubriendo el rango desde el LOQ/LOQp hasta no menos del 120 % de la concentración objetivo. Analizar cada solución una vez. Realizar el análisis de regresión lineal (respuesta vs concentración) y calcular el coeficiente de correlación (r), la intersección con el eje Y (%), la pendiente, la suma del cuadrado de los residuales y factores de respuesta relativos (FRR).	r: Mín. 0,990.



Elementos de Validación	Diseño experimental	Criterio de aceptación
Exactitud	<p>Preparar tres soluciones de muestra de producto (o matriz: placebo + API) fortificadas con las impurezas conocidas al nivel del LOQ/LOQp.</p> <p>Preparar tres soluciones de muestra de producto (o matriz: placebo + API) fortificadas con las impurezas conocidas al 100% de la concentración objetivo.</p> <p>Preparar tres soluciones de muestra de producto (o matriz: placebo + API) fortificadas con las impurezas conocidas al 120% de la concentración objetivo.</p> <p>Preparar una solución de muestra de producto (o matriz: placebo + API) sin fortificar, como control blanco.</p> <p>Realizar una determinación de cada solución.</p> <p>Calcular la recuperación individual, la recuperación promedio y la desviación estándar relativa, a cada nivel.</p>	<p>- %<u>Rec. Promedio al nivel del LOQ/LOQp</u>: 70,0% - 130,0%.</p> <p>- %<u>RSD</u>: Máx. 30,0 %, n = Mín. 9.</p> <p>- %<u>Rec. Promedio a niveles 100% y 120%</u>: 80,0% - 120,0%.</p> <p>- %<u>RSD</u>: Máx. 20,0 %, n = Mín. 9.</p>
Rango	Se define en el intervalo de concentraciones en el cual linealidad, precisión y exactitud cumplen con el criterio de aceptación.	Mínimo LOQ/LOQp – 120 %.
Límite de cuantificación	<u>Exactitud</u> : Preparar tres soluciones mezcla de estándar de API y estándar de impureza, al nivel del LOQ/LOQp, en presencia de la matriz. Analizar cada preparación una vez.	% <u>Rec.</u> : 70,0 % - 130,0 %
	<u>Precisión</u> : Preparar una solución mezcla de estándar de API y estándar de impureza, al nivel del LOQ/LOQp. Analizar por sextuplicado.	- S/N promedio: Min. 10:1. - RSD (%): Max. 25,0 %.
Límite de detección	Preparar una solución mezcla de estándar de API y estándar de impureza diluyendo a 1/3 la solución preparada al nivel LOQ/LOQp.	- S/N: Min. 2:1 o 3:1
Precisión: Repetibilidad	<p>Preparar seis soluciones de muestra de producto (o matriz: placebo + API), de la dosis menor; fortificadas con impurezas conocidas aproximadamente al 100% de la concentración objetivo. Y preparar seis soluciones de muestra de producto (o matriz: placebo + API) de la dosis mayor; fortificadas con impurezas conocidas aproximadamente al 100% de la concentración objetivo.</p> <p>Otra forma (que debe incluir justificación) es preparar 6 soluciones de muestra del producto del peor caso (o matriz: placebo + API) fortificado con impurezas conocidas aproximadamente al 100% de la concentración objetivo.</p> <p>En todos los casos analizar cada solución una vez.</p> <p>Calcular el promedio (% área, % p/p) y la desviación estándar relativa de cada impureza, para n = 6.</p>	<p>- Nivel LOQ – 0,49 %: %RSD: Máx. 25,0 % (n=6)</p> <p>- Nivel 0,50 – 1,0 %: %RSD: Máx. 20,0 % (n=6)</p> <p>- Nivel > 1,0 %: %RSD: Máx. 15,0 % (n=6)</p>
Precisión: Precisión intermedia	<p>Un segundo analista repetirá el ensayo de Repetibilidad, en lo posible en un día diferente, usando un sistema y columna diferente.</p> <p>Calcular el promedio (% área, % p/p) y la desviación estándar relativa de cada impureza, por cada analista, para n = 6.</p> <p>Calcular el promedio (% área, % p/p) y la desviación estándar relativa de cada impureza, entre los analistas, para n = 12.</p>	<p><u>Para cada analista</u>, Ver Repetibilidad</p> <p><u>Para ambos analistas</u>: - Nivel LOQ – 0,50 %: %RSD: Máx. 30,0% (n=12) - Nivel 0,51 – 1,0 %:</p>



Elementos de Validación	Diseño experimental	Criterio de aceptación
		%RSD: Máx. 25,0% (n=12) - Nivel > 1,0 %: %RSD: Máx. 20,0% (n=12)
Estudio de sesgo del filtro	Evaluar la recuperación entre los resultados de la muestra filtrada y sin filtrar.	- %Rec.: aplicar los mismos criterios que en el parámetro de exactitud.
Estabilidad de Solución	<u>Solución estándar y muestra</u> : Preparar una solución de estándar y muestra de acuerdo a la metodología analítica. Ajustar a las condiciones de almacenamiento (envase primario) y temperatura (ambiente, heladera, HPLC, etc). Calcular la recuperación entre los resultados obtenidos (% área, % p/p, etc) en cada tiempo de estabilidad (n), con respecto al tiempo inicial.	- %Rec. Estándar: 95,0% - 105,0% (para API) y 90,0%-110,0% (para cada impureza conocida). - %Rec. Muestra: Aplicar los mismos criterios que en el parámetro de exactitud.
Robustez	Condiciones de cambios recomendados ² : (1) <u>pH del buffer</u> : ± 0,2 unidades (HPLC). (2) <u>Composición de la fase móvil</u> : ± 2% (normalmente para componentes minoritarios de la Fase móvil) para modo isocrático, o pendiente de gradiente: ± 2% (para Fase móvil a todos los tiempos) para modo gradiente (HPLC). (3) <u>Concentración del buffer</u> : ± 10% (HPLC). (4) <u>Temperatura de la columna</u> : ± 5°C (HPLC, GC). (5) <u>Velocidad de Flujo</u> : ± 10% (HPLC, GC). (6) <u>Cambio de columna</u> : otra marca, similares características (HPLC, GC).	- Cumple con las condiciones del System suitability. - %Rec.: aplicar los mismos criterios que en el parámetro de exactitud. ³

¹ Por ejemplo, UV (200 Wh/m², a 22,5 W/m² por 8,9 h = 200 Wh/m², o a 10 W/m² por 20 h = 200 Wh/m²) y luz blanca (1,2 millones lux horas, a 133 klux por 9 h = 1,2 millones lux horas, o a 55 klux por 21,8 h = 1,2 millones lux horas).

² Condiciones críticas de los factores del método en el método deberían ser evaluadas en el estudio de robustez y actualizadas en el método. Variaciones de los factores del método deberían ser técnicamente justificables.

³ Por ejemplo, utilizando una solución del análisis de precisión, evaluar la recuperación de cada impureza conocida en cada condición de cambio respecto de la condición normal y cumple con cualquier otro criterio de los atributos críticos definidos para el método.



Tabla 5: Validación de método de determinación de impurezas (test límite) de API

Elementos de Validación	Diseño experimental	Criterio de aceptación
Adecuación del Sistema (System suitability)	Realizar el system suitability en el método	Cumplir criterio de system suitability o hacer la justificación necesaria
Precisión: Repetibilidad	Preparar dos soluciones de muestra de API (si el analito en la muestra es mayor al 50% del nivel límite). De otra forma, preparar dos soluciones de muestra de API fortificadas con el analito al nivel límite. Analizar cada solución una vez.	Diferencia (%) absoluta entre las dos muestras: dentro del 50% para el analito.
Límite de detección	Analizar por triplicado una solución estándar preparada al nivel del LOD.	Promedio S/N: Min. 2:1 o 3:1.
Especificidad-Interferencia	Analizar el diluyente y otras fuentes de interferencia si corresponde.	No se observan interferencias del disolvente con el/los analito/s de interés.
Estudio de sesgo del filtro	Evaluar la recuperación entre la señal analítica obtenida en la muestra filtrada y sin filtrar.	<u>%Rec:</u> 70,0 % – 130,0 %
Estabilidad de la Solución ¹	<u>Solución estándar y muestra:</u> Preparar una solución de estándar y muestra de acuerdo a la metodología analítica. Ajustar a las condiciones de almacenamiento (envase primario) y temperatura (ambiente, heladera, HPLC, etc). Calcular la recuperación entre la señal analítica en cada tiempo de estabilidad (n), con respecto al tiempo inicial.	- <u>%Rec. Estándar:</u> 90% - 110% - <u>%Rec. Muestra:</u> 80% - 120%

¹Usando soluciones recientemente preparadas.



Tabla 6: Validación de método de determinación de impurezas (test límite) en producto terminado.

Elementos de Validación	Diseño experimental	Criterio de aceptación
Adecuación del Sistema (System suitability)	Realizar el system suitability según metodología analítica.	Cumplir criterio de system suitability o hacer la justificación necesaria.
Precisión: Repetibilidad	Preparar dos soluciones de muestra de producto (si el analito en la muestra es mayor al 50% del nivel límite). De otra forma, preparar dos soluciones de muestra de producto fortificadas con el analito al nivel límite. Analizar cada solución una vez.	La diferencia entre dos muestras: dentro del 50% para el analito.
Límite de detección	Analizar por triplicado una solución estándar preparada al nivel del LOD.	S/N promedio: Min. 2:1 o 3:1.
Especificidad-Interferencia	Analizar el diluyente y otras fuentes de interferencia si corresponde.	No se observan interferencias del disolvente o de la matriz con el/los analito/s de interés.
Estudio de sesgo del filtro	Evaluar la recuperación entre la señal analítica obtenida en la muestra filtrada y sin filtrar.	<u>%Rec</u> : 70,0 % – 130,0 %
Estabilidad de Solución ¹	<u>Solución estándar y muestra</u> : Preparar una solución de estándar y muestra de acuerdo a la metodología analítica. Ajustar a las condiciones de almacenamiento (envase primario) y temperatura (ambiente, heladera, HPLC, etc). Calcular la recuperación entre la señal analítica en cada tiempo de estabilidad (n), con respecto al tiempo inicial.	- <u>%Rec. Estándar</u> : 90% - 110% - <u>%Rec. Muestra</u> : 80% - 120%

¹ Usando soluciones recientemente preparadas.



Tabla 7: Validación de método de disolución.

Elementos de Validación	Diseño experimental	Criterio de aceptación
Adecuación del Sistema (System suitability)	Realizar el system suitability en el método	Cumplir criterio de system suitability o hacer la justificación necesaria
Especificidad-Interferencia	Analizar el diluyente, el placebo y otras fuentes de interferencia si corresponde.	No se observan interferencias del disolvente o de la matriz con el/los analito/s de interés.
Linealidad	Preparar soluciones estándares en al menos cinco niveles de concentración cubriendo el rango desde la concentración más baja (límite inferior del rango: -20%, o 5% de la concentración objetivo, el que sea mayor) a la concentración más alta (límite superior del rango: +20%, o 120% de la concentración objetivo, el que sea mayor) Analizar cada solución una vez. Realizar el análisis de regresión lineal (respuesta vs concentración) y calcular el coeficiente de correlación (r), la intersección con el eje Y (%), la pendiente y la suma del cuadrado de los residuales	r: Mín. 0,990.
Exactitud	Preparar tres soluciones de muestra (placebo fortificado con API) al nivel del rango menor - 20%, o al nivel del 5%, el que sea menor. Preparar tres soluciones de muestra (placebo fortificado con API) al 100% de la concentración objetivo. Preparar tres soluciones de muestra (placebo fortificado con API) al nivel del rango mayor + 20%, o al nivel del 120%, el que sea mayor. Analizar cada solución una vez. Calcular la recuperación individual, la recuperación promedio y la desviación estándar relativa, a cada nivel.	- <u>Recuperación promedio</u> : 85,0% - 115,0% del nivel menor. - <u>Recuperación promedio</u> : 90,0 - 110,0% para el nivel del 100% y niveles mayores
Rango	Se define en el intervalo de concentraciones en el cual linealidad, precisión y exactitud cumplen con el criterio de aceptación.	Desde -20%, o 5%, hasta +20%, o 120%.
Precisión: Repetibilidad	Ensayar seis muestras de producto (dosis menor) y seis muestras de producto (dosis mayor) según la metodología analítica (un solo punto o perfil de disolución) Analizar una vez la muestra obtenida en el/los punto/os de colecta especificados en la metodología analítica (o perfil de disolución si corresponde). Calcular la liberación individual (%), liberación promedio (%) y la desviación estándar relativa entre las seis determinaciones por punto de colecta.	- <u>%RSD</u> : Máx. 20,0 % nivel inferior, n = 6. - <u>%RSD</u> : Máx. 15,0 % nivel medio, n = 6. - <u>%RSD</u> : Máx. 5,0 % nivel al tiempo Q, n = 6.
Precisión: Precisión intermedia	Un segundo analista repetirá el ensayo de Repetibilidad, en lo posible en un día diferente, usando un sistema y columna diferente. Calcular la liberación individual (%), liberación promedio (%) y la desviación estándar relativa entre las seis determinaciones por punto de colecta.	- <u>Por cada analista</u> : Ver Repetibilidad - <u>Entre analistas</u> : - <u>%RSD</u> : Máx. 25,0 % nivel inferior, n = 6.



Elementos de Validación	Diseño experimental	Criterio de aceptación
		- %RSD: Máx. 20,0 % nivel medio, n = 6. - %RSD: Máx. 10,0 % nivel al tiempo Q, n = 6.
Estudio de sesgo del filtro	Evaluar la recuperación entre los resultados de la muestra filtrada y sin filtrar.	%Rec: aplicar los mismos criterios del parámetro de exactitud.
Estabilidad de la solución	<u>Solución estándar y muestra:</u> Preparar una solución de estándar y muestra de acuerdo a la metodología analítica. Ajustar a las condiciones de almacenamiento (envase primario) y temperatura (ambiente, heladera, HPLC, etc). Calcular la recuperación entre los resultados obtenidos (% área, % p/p, etc) en cada tiempo de estabilidad (n), con respecto al tiempo inicial.	- %Rec. Estándar: 95,0% - 105,0% - %Rec. Muestra: Aplicar los mismos criterios que en el parámetro de exactitud.
Robustez	Condiciones de cambios recomendados ² (1) <u>pH del buffer:</u> $\pm 0,2$ unidades (HPLC). (2) <u>Composición de la fase móvil:</u> $\pm 2\%$ (normalmente para componentes minoritarios de la Fase móvil) para modo isocrático, o pendiente de gradiente: $\pm 2\%$ (para Fase móvil a todos los tiempos) para modo gradiente (HPLC). (3) <u>Concentración del buffer:</u> $\pm 10\%$ (HPLC). (4) <u>Temperatura de la columna:</u> $\pm 5^{\circ}\text{C}$ (HPLC, GC). (5) <u>Velocidad de Flujo:</u> $\pm 10\%$ (HPLC, GC). (6) <u>Cambio de columna:</u> otra marca, similares características (HPLC, GC).	- Cumple con las condiciones del System suitability. - %Rec.: aplicar los mismos criterios que en el parámetro de exactitud. ³

¹ Para un producto con una disolución de alta variabilidad (% disuelto), un RSD (%): Max. 10,0% (al tiempo-Q) es justificable.

² Condiciones críticas /factores del método en el método deberían ser evaluadas en el estudio de robustez y actualizadas en el método. Variaciones de los factores del método deberían ser técnicamente justificables.

³ Usando una muestra del análisis de precisión al nivel del 100%, evaluar la recuperación entre los resultados de cada condición de cambio vs la condición normal y cumple cualquier otro criterio de los atributos críticos definidos para el método, si corresponde.



Tabla 8: Validación de método de identificación para API

Elementos de Validación	Diseño experimental	Criterio de aceptación
Adecuación del Sistema (System suitability)	Realizar el system suitability en el método si corresponde	Cumplir criterio de system suitability si corresponde
Especificidad-Selectividad	Analizar una muestra contra estándar usando el método, si corresponde	Identificación positiva
Interferencia	Analizar el diluyente y otras fuentes de interferencia si corresponde.	Identificación negativa del diluyente y otras fuentes de interferencia

Tabla 9: Validación de método de identificación en producto terminado

Elementos de Validación	Diseño experimental	Criterio de aceptación
Adecuación del Sistema (System suitability)	Realizar el system suitability en el método si corresponde	Cumplir criterio de system suitability si corresponde
Especificidad-Selectividad	Analizar una muestra contra estándar usando el método, si corresponde	Identificación positiva
Interferencia	Analizar el diluyente y otras fuentes de interferencia si corresponde.	Identificación negativa del diluyente y otras fuentes de interferencia



Tabla 10: Validación de método de GC para solventes residuales en API

Elementos de Validación	Diseño experimental	Criterio de aceptación
Adecuación del Sistema (System suitability)	Realizar el system suitability según metodología analítica.	Cumplir criterio de system suitability o hacer la justificación necesaria
Especificidad-Interferencia	Analizar el diluyente y otras fuentes de interferencia si corresponde. Inyectar el solvente residual individual para identificación si corresponde	No se observan interferencias del disolvente con el/los analito/s de interés.
Linealidad	Preparar soluciones estándares de los solventes residuales en al menos cinco niveles de concentraciones, cubriendo el rango desde el límite de cuantificación (LOQ/LOQp) hasta no menos del 120 % del límite USP <467>. Realizar una determinación de cada preparación por cada nivel. Realizar el análisis de regresión lineal (respuesta vs concentración) y calcular el coeficiente de correlación (r), la intersección con el eje Y (%), la pendiente y la suma del cuadrado de los residuales.	r: Mín. 0,990.
Precisión: Repetibilidad	Preparar seis soluciones de muestras de API fortificadas con los solventes residuales aproximadamente al 100% de la concentración objetivo. Calcular el promedio para cada solvente y la desviación estándar relativa, para el número de determinaciones n = 6. Analizar cada solución una vez.	% RSD para solventes >1000 ppm: Máx.15 % (n=6). % RSD para solventes 100-1000 ppm: Máx.20 % (n=6). % RSD para solventes <100 ppm: Máx.30 % (n=6).
Precisión: Precisión intermedia	Un segundo analista repetirá el ensayo de Repetibilidad, en lo posible en un día diferente, usando un sistema y columna diferente. Calcular el promedio (% área, % p/p) y la desviación estándar relativa de cada solvente residual, por cada analista, para n = 6. Calcular el promedio (% área, % p/p) y la desviación estándar relativa de cada solvente residual, entre los analistas, para n = 12.	<u>Para cada analista,</u> Ver Repetibilidad <u>Para ambos analistas,</u> - RSD (%) para solventes > 1000 ppm: Máx.25 % (n=12). - RSD (%) para solventes 100-1000 ppm: Máx. 30 % (n=12). - RSD (%) para solventes < 100 ppm: Máx.40 % (n=12).
Exactitud	Preparar tres soluciones de muestras de API fortificadas con los solventes residuales al nivel del LOQ/LOQp. Preparar tres soluciones de muestras de API fortificadas con los solventes residuales al 100% de la concentración objetivo. Preparar tres soluciones de muestras de API fortificadas con los solventes residuales al 120% de la concentración objetivo. Preparar una solución de muestra de API sin fortificar como control blanco. Realizar una determinación de cada preparación. Calcular la recuperación individual, la recuperación promedio y la desviación estándar relativa a cada nivel.	- %Rec. promedio LOQ/LOQp: 70,0 % - 130,0 %. - % RSD: Máx. 30 %. - %Rec. promedio 100 % y 120 %: 75,0 % - 125,0 %. - %RSD: Máx. 25 %



Elementos de Validación	Diseño experimental	Criterio de aceptación
Límite de cuantificación	Analizar por sextuplicado una solución de estándar preparada al nivel del LOQ/LOQp.	- S/N promedio: Min. 10:1. - RSD (%): Máx. 15 %.
Límite de detección	Analizar por triplicado una solución de estándar diluyendo a 1/3 la solución preparada al nivel del LOQ/LOQp.	- S/N: Min. 2:1 o 3:1
Rango	Se define en el intervalo de concentraciones en el cual linealidad, precisión y exactitud cumplen con el criterio de aceptación.	Desde el LOQ/LOQp hasta no menos del 120% del límite USP <467>
Elementos de Validación	Diseño experimental	Criterio de aceptación
Estabilidad de Solución ¹	<u>Solución estándar y muestra:</u> Preparar una solución de estándar y muestra de acuerdo a la metodología analítica. Ajustar a las condiciones de almacenamiento (envase primario) y temperatura (ambiente, heladera, GC, etc). Calcular la recuperación entre los resultados obtenidos (% área, % p/p, etc) en cada tiempo de estabilidad (n), con respecto al tiempo inicial.	- <u>%Rec. Estándar:</u> 90,0 %- 110,0 %. - <u>%Rec. Muestra:</u> 80,0 % - 120,0 %
Robustez	Condiciones de cambio recomendadas: ² (1) <u>Temperatura de la columna:</u> $\pm 5^{\circ}\text{C}$. (2) <u>Velocidad de Flujo:</u> $\pm 10\%$. (3) <u>Cambio de columna:</u> otra marca, similares características.	- Cumple con las condiciones del System suitability. - <u>%Rec.:</u> aplicar los mismos criterios que en el parámetro de exactitud. ³

¹ Este estudio normalmente es realizado si se usan soluciones recientemente preparadas y solamente si la estabilidad de la solución es una preocupación.

² Condiciones críticas de los factores del método en el método deberían ser evaluadas en el estudio de robustez y actualizadas en el método. Variaciones de los factores del método deberían ser técnicamente justificables.

³ Por ejemplo, usando la muestra de precisión, comparando los resultados de cada condición de cambio vs la condición normal y cumple cualquier otro criterio de los atributos críticos definidos para el método.



Tabla 11: Validación de método de GC de solventes residuales en producto terminado

Elementos de Validación	Diseño experimental	Criterio de aceptación
Adecuación del Sistema (System suitability)	Realizar el system suitability en el método	Cumplir criterio de system suitability o hacer la justificación necesaria
Especificidad-Interferencia	Analizar el diluyente, el placebo, API y otras fuentes de interferencia si corresponde. Inyectar cada solvente residual individual para identificación si corresponde.	No se observan interferencias del disolvente o la matriz o el activo con el/los analito/s de interés.
Linealidad	Preparar soluciones estándares de los solventes residuales en al menos cinco niveles de concentraciones, cubriendo el rango desde el límite de cuantificación (LOQ/LOQp) hasta no menos del 120 % del límite USP <467>. Realizar una determinación de cada preparación por cada nivel. Realizar el análisis de regresión lineal (respuesta vs concentración) y calcular el coeficiente de correlación (r), la intersección con el eje Y (%), la pendiente y la suma del cuadrado de los residuales.	r: Mín. 0,990.
Exactitud	Preparar tres soluciones de muestra de producto (o matriz: placebo + API) fortificadas con los solventes residuales al nivel del LOQ/LOQp. Preparar tres soluciones de muestra de producto (o matriz: placebo + API) fortificadas con los solventes residuales al 100 % de la concentración objetivo. Preparar tres soluciones de muestra de producto (o matriz: placebo + API) fortificadas con los solventes residuales al 120 % de la concentración objetivo. Preparar una solución de muestra de producto (o matriz: placebo + API) sin fortificar, como control blanco. Analizar cada solución una vez. Calcular la recuperación individual, la recuperación promedio y la desviación estándar relativa, a cada nivel.	- % <u>Rec. promedio</u> <u>LOQ/LOQp</u> : 70,0 % - 130,0 %. - % <u>RSD</u> : Máx. 30 %. - % <u>Rec. promedio 100 % y 120 %</u> : 75,0 % - 125,0 %. - % <u>RSD</u> : Máx. 25 %
Rango	Se define en el intervalo de concentraciones en el cual linealidad, precisión y exactitud cumplen con el criterio de aceptación.	LOQ/LOQp – 120 % del límite de USP <467>.
Precisión: Repetibilidad	Preparar seis soluciones de muestras de producto fortificadas con los solventes residuales aproximadamente al 100% de la concentración objetivo. Analizar cada solución una vez. Calcular el promedio (% área, %p/p) y la desviación estándar relativa de cada solvente residual para el total de determinaciones, n = 6.	% <u>RSD para solventes ≥ 1000 ppm</u> : Máx.15 % (n=6). % <u>RSD para solventes 100-1000 ppm</u> : Máx.20 % (n=6). % <u>RSD para solventes < 100 ppm</u> : Máx.30 % (n=6).
Precisión: Precisión intermedia	Un segundo analista repetirá el ensayo de Repetibilidad, en lo posible en un día diferente, usando un sistema y columna diferente. Calcular el promedio (% área, % p/p) y la desviación estándar relativa de cada solvente residual, por cada analista, para n = 6.	<u>Para cada analista,</u> <u>Ver Repetibilidad</u> <u>Para ambos analistas,</u>



Elementos de Validación	Diseño experimental	Criterio de aceptación
	Calcular el promedio (% área, % p/p) y la desviación estándar relativa de cada solvente residual, entre los analistas, para n = 12.	- <u>RSD (%) para solventes > 1000 ppm</u> : Máx.25 % (n=12). - <u>RSD (%) para solventes 100-1000 ppm</u> : Máx. 30 % (n=12). - <u>RSD (%) para solventes < 100 ppm</u> : Máx.40 % (n=12).
Límite de cuantificación	Analizar por sextuplicado una solución de estándar preparada al nivel del LOQ/LOQp.	- S/N promedio: Min. 10:1. - RSD (%): Máx. 15 %.
Límite de detección	Analizar por triplicado una solución de estándar diluyendo a 1/3 la solución preparada al nivel del LOQ/LOQp.	- S/N: Min. 2:1 o 3:1
Rango	Se define en el intervalo de concentraciones en el cual linealidad, precisión y exactitud cumplen con el criterio de aceptación.	Desde el LOQ/LOQp hasta no menos del 120% del límite USP <467>
Estabilidad de Solución ¹	<u>Solución estándar y muestra</u> : Preparar una solución de estándar y muestra de acuerdo a la metodología analítica. Ajustar a las condiciones de almacenamiento (envase primario) y temperatura (ambiente, heladera, GC, etc). Calcular la recuperación entre los resultados obtenidos (% área, % p/p, etc) en cada tiempo de estabilidad (n), con respecto al tiempo inicial.	- <u>%Rec. Estándar</u> : 90,0 % - 110,0 %. - <u>%Rec. Muestra</u> : 80,0 % - 120,0 %
Robustez	Condiciones de cambio recomendadas: ² (1) <u>Temperatura de la columna</u> : $\pm 5^{\circ}\text{C}$. (2) <u>Velocidad de Flujo</u> : $\pm 10\%$. (3) <u>Cambio de columna</u> : otra marca, similares características.	- Cumple con las condiciones del System suitability. - <u>%Rec.</u> : aplicar los mismos criterios que en el parámetro de exactitud. ³

¹ Este estudio normalmente es realizado si se usan soluciones recientemente preparadas y solamente si la estabilidad de la solución es una preocupación.

² Condiciones críticas de los factores del método en el método deberían ser evaluadas en el estudio de robustez y actualizadas en el método. Variaciones de los factores del método deberían ser técnicamente justificables.

³ Por ejemplo, usando la muestra de precisión, comparando los resultados de cada condición de cambio vs la condición normal y cumple cualquier otro criterio de los atributos críticos definidos para el método.



Tabla 12: Validación de método de Distribución de tamaño de partículas

Elemento de Validación	Diseño experimental	Criterio de aceptación
Precisión: Repetibilidad	<p>Reconstituir la cantidad de muestras suficientes con el solvente adecuado como para obtener la cantidad de suspensión necesaria para realizar seis mediciones.¹</p> <p>Realizar las 6 mediciones a partir de una suspensión homogénea.</p> <p>Calcular los resultados individuales (χ_{10}, χ_{50} y χ_{90}), los resultados promedio y la desviación estándar relativa de las seis mediciones.</p>	<p><u>Para χ_{10} (o χ_{90}),</u> % RSD: Máx. 15%, para n = 6, o Máx.30% para tamaños de partículas menores a 10 μm.</p> <p><u>Para χ_{50},</u> % RSD: Máx. 10%, para n = 6 o Máx. 20% para los tamaños de partículas menores a 10 μm.</p>
Precisión: Precisión intermedia	<p>Otro analista, repite el mismo procedimiento realizado por el primer analista en la ejecución de Repetibilidad, en un día diferente.</p> <p>Calcular los resultados individuales (χ_{10}, χ_{50} y χ_{90}), los resultados promedio de las seis muestras y calcular la desviación estándar relativa de las seis mediciones.</p> <p>Calcular los resultados individuales (χ_{10}, χ_{50} y χ_{90}), los resultados promedio de las seis muestras y calcular la desviación estándar relativa de las doce mediciones.</p>	<p><u>Para cada analista:</u> Ver Repetibilidad</p> <p><u>Para ambos analistas,</u> <u>Para χ_{10} (o χ_{90}),</u> % RSD: Máx. 20 %, para n = 12, o Máx.35% para tamaños de partículas menores a 10 μm.</p> <p><u>Para χ_{50},</u> % RSD: Máx. 15 %, para n = 12, o Máx. 25 % para los tamaños de partículas menores a 10 μm.</p>
Robustez (Estabilidad de la suspensión)	<p>Evaluar la estabilidad de la suspensión de muestra a diferentes tiempos preestablecidos manteniendo la suspensión en las condiciones normales del laboratorio</p>	<p><u>Para χ_{10} (o χ_{90}),</u> % RSD: Máx. 20%, o Máx.30% para tamaños de partículas menores a 10 μm.</p> <p><u>Para χ_{50},</u> % RSD: Máx. 10% o Máx. 15% para los tamaños de partículas menores a 10 μm.</p>
Robustez	<p>Condiciones de cambio recomendadas:</p> <ul style="list-style-type: none"> - <u>Cambio de velocidad de agitación:</u> ± 500 rpm. - <u>Cambio de porcentaje de obscuración:</u> $\pm 5\%$. - <u>Cambio de tiempo de sonicado:</u> ± 10 seg (si corresponde). 	<p>System suitability y resultados de muestras cumplen el criterio de aceptación.</p> <p>En caso contrario, las condiciones específicas de robustez deben ser detalladas en el método de análisis.</p>

¹ Examinar la muestra en un dispersante adecuado bajo el microscopio para asegurar la ausencia de aglomerados. Esta examinación también da una idea aproximada de la distribución de tamaño de partículas en la muestra. Si el microscopio tiene la capacidad de tomar fotografías, tomar las fotografías de la muestra y poner al menos una fotografía de la muestra en el cuaderno de validación del método. Si el microscopio no tiene la capacidad de tomar fotografías, un segundo analista debe confirmar y documentar los resultados del primer analista en el cuaderno.

UCSF

Universidad Católica
de Santa Fe

Farmacia



Facultad de Ciencias de la Salud

ANEXO II

Trazabilidad de Raw Data



Parámetros de Validación	Referencia	Paginas	Archivos Instrumentales*
Especificidad	Analista: Cuaderno:		System name: Project name: Date Acquired: Sample Set Name: Method Set: Processing Method:
Linealidad	Analista: Cuaderno:		System name: Project name: Date Acquired: Sample Set Name: Method Set: Processing Method:
Exactitud	Analista: Cuaderno:		System name: Project name: Date Acquired: Sample Set Name: Method Set: Processing Method:
LOD-LOQ	Analista: Cuaderno:		System name: Project name: Date Acquired: Sample Set Name: Method Set: Processing Method:
Precisión (Repetibilidad)	Analista: Cuaderno:		System name: Project name: Date Acquired: Sample Set Name: Method Set: Processing Method:
Precisión Intermedia	Analista: Cuaderno:		System name: Project name: Date Acquired: Sample Set Name: Method Set: Processing Method:

UCSFUniversidad Católica
de Santa Fe**Farmacia****Facultad de Ciencias de la Salud**

Parámetros de Validación	Referencia	Paginas	Archivos Instrumentales*
Estabilidad de las soluciones	Analista: Cuaderno:		System name: Project name: Date Acquired: Sample Set Name: Method Set: Processing Method:
Sesgo del Filtro	Analista: Cuaderno:		System name: Project name: Date Acquired: Sample Set Name: Method Set: Processing Method:
Robustez: Cambios de Parámetros.	Analista: Cuaderno:		System name: Project name: Date Acquired: Sample Set Name: Method Set: Processing Method:

*N/A (No Aplica): para métodos no instrumentales y/o métodos instrumentales que no generan base electrónica de datos.