

## 1130. VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Las buenas prácticas de fabricación y control requieren que los métodos analíticos empleados para evaluar las especificaciones establecidas sean apropiados.

### PRESENTACIONES DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Las presentaciones de métodos analíticos nuevos o revisados deben contener suficiente información para permitir la evaluación de los procedimientos propuestos. La información puede variar según el tipo de valoración empleada. Sin embargo, en la mayoría de los casos una presentación constará de las siguientes secciones.

*Justificación* - Esta sección debe identificar la necesidad y las ventajas del método propuesto. Para métodos revisados, debe proporcionarse una comparación de las limitaciones del método vigente en los libros oficiales y las ventajas ofrecidas por el método propuesto.

*Método analítico propuesto* - Esta sección debe contener la descripción completa y suficientemente detallada del método analítico para permitir que personas capacitadas puedan repetirlo. La redacción debe incluir todos los parámetros operativos importantes e indicaciones específicas, como por ej., la preparación de reactivos, las condiciones de aptitud del sistema, descripción de los blancos empleados, precauciones y fórmulas para calcular los resultados.

*Datos* - Esta sección debe proporcionar documentación detallada y completa de la validación del método, incluyendo datos experimentales y cálculos que fundamenten cada uno de los atributos estudiados.

### ATRIBUTOS ANALÍTICOS

La validación de un método analítico es el proceso por el cual se establece, por medio de estudios de laboratorio, que un método es apropiado para el uso propuesto. A continuación se definen cada uno de los atributos necesarios para validar un método analítico junto con una breve descripción de cómo deben determinarse.

#### **Exactitud**

*Definición* - La exactitud de un método analítico es la proximidad entre el resultado obtenido y el valor real. La exactitud debe establecerse en todo el intervalo especificado para el método analítico.

*Determinación* - En el caso de la valoración de una sustancia, la exactitud puede determinarse por la aplicación del método analítico a una muestra de

pureza conocida (como por ej., una *Sustancia de referencia*) o por comparación de los resultados del método analítico propuesto con los de otro método cuya exactitud haya sido establecida.

En el caso de la valoración de una sustancia en un producto farmacéutico, la exactitud puede determinarse mediante la aplicación del método analítico a mezclas preparadas con todos los componentes del producto a las cuales se les ha agregado cantidades conocidas del analito dentro del intervalo del método.

Si no es posible obtener muestras de todos los componentes del producto, puede ser aceptable agregar cantidades conocidas del analito al producto o comparar los resultados obtenidos con un segundo método cuya exactitud haya sido establecida.

En el caso del análisis cuantitativo de impurezas, la exactitud debe evaluarse sobre muestras (sustancia o producto farmacéutico) a las que se les han agregado cantidades conocidas de impurezas. Si es imposible obtener muestras de las impurezas y/o los productos de degradación, es aceptable comparar los resultados obtenidos por un método independiente (método farmacopeico u otro método analítico validado). En ausencia de otra información, puede ser necesario calcular la cantidad de impureza comparando su respuesta con la respuesta de la sustancia, en estos casos debe emplearse el factor de respuesta si se conoce.

La exactitud debe evaluarse empleando un mínimo de nueve determinaciones sobre un mínimo de tres niveles de concentración que cubran el intervalo especificado (como por ej., tres concentraciones/ tres repeticiones completas del método). La exactitud se calcula como el porcentaje de recuperación obtenido a partir de la valoración de una cantidad agregada conocida de analito en la muestra, o como la diferencia entre la media y el valor aceptado como verdadero junto con los intervalos de confianza.

#### **Precisión**

*Definición* - La precisión de un método analítico es el grado de concordancia entre los resultados del ensayo individual cuando el método se aplica repetidamente a varias alícuotas de una muestra homogénea. La precisión de un método analítico, generalmente se expresa como la desviación estándar o desviación estándar relativa (coeficiente de variación) de una serie de mediciones. La precisión puede ser considerada en tres niveles: repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad. La repetibilidad expresa la precisión bajo las mismas condiciones operativas en

un intervalo de tiempo corto. La precisión intermedia expresa las variaciones intralaboratorio: diferentes días, diferentes analistas, diferentes equipos, etc. La reproducibilidad expresa la precisión entre laboratorios (estudios colaborativos).

*Determinación* - La precisión de un método analítico se determina mediante el análisis de un número suficiente de alícuotas de una muestra homogénea, lo que permite un cálculo estadísticamente válido de la desviación estándar o la desviación estándar relativa. En este contexto, las valoraciones son análisis independientes que se llevan a cabo siguiendo el procedimiento analítico completo desde la preparación de la muestra hasta el resultado final del ensayo.

La repetibilidad puede evaluarse empleando un mínimo de nueve determinaciones que cubran el intervalo especificado para el método (como por ej., tres concentraciones/tres repeticiones de cada una) o un mínimo de seis determinaciones al 100 % del valor declarado.

### **Especificidad**

*Definición* - La especificidad es la capacidad de un método para evaluar inequívocamente al analito en presencia de los componentes que pueden estar presentes, tales como impurezas, productos de degradación, componentes de la matriz, etc. La falta de especificidad de un método analítico puede ser compensada por otros procedimientos analíticos.

Para ensayos de identificación esta definición implica asegurar la identidad del analito, para ensayos de pureza implica asegurar que el método permita una exacta determinación del contenido de impurezas, es decir las sustancias relacionadas, límite de metales pesados, límite de impurezas orgánicas volátiles, de productos de degradación, etc. Para valoraciones asegurar un resultado que permita establecer el contenido o potencia del analito en una muestra.

*Determinación* - En el caso del análisis cualitativo (ensayos de identificación) debe demostrarse la capacidad de discriminar entre sustancias de estructuras estrechamente relacionadas que pudieran estar presentes. La discriminación del método puede ser confirmada mediante la obtención de resultados positivos (como por ej., por comparación con una *Sustancia de referencia*), a partir de muestras que contienen el analito, junto con resultados negativos, a partir de muestras que no contienen el analito. Además, el ensayo de identificación puede aplicarse a materiales estructuralmente parecidos o estrechamente relacionados al analito, para confirmar que no se obtiene una respuesta positiva.

En el caso del análisis de impurezas, la especificidad puede establecerse por el agregado de cantidades apropiadas de impurezas a la sustancia o al producto farmacéutico y demostrando que estas impurezas son determinadas con la precisión y exactitud necesarias.

En el caso de una valoración, se debe demostrar que el método no se ve afectado por la presencia de impurezas o excipientes. En la práctica, esto puede realizarse agregando, a la sustancia o al producto farmacéutico, cantidades apropiadas de impurezas o excipientes y demostrando que el resultado de la valoración no se ve afectado por la presencia de estos materiales extraños. Si no se dispone de los productos de degradación o impurezas, la especificidad puede ser demostrada por comparación de los resultados del ensayo con muestras que contienen impurezas o productos de degradación a través de un segundo método independiente (como por ej., métodos farmacopeicos u otro método analítico validado). Estas comparaciones deberían incluir muestras almacenadas bajo condiciones exigentes: luz, calor, humedad, hidrólisis ácido base y oxidación. En el caso de valoraciones los dos resultados deberían compararse. En el caso de ensayos cromatográficos para impurezas deberían compararse los perfiles cromatográficos.

Para métodos cromatográficos instrumentales, deben desarrollarse cromatogramas para demostrar la especificidad. Los ensayos de pureza de pico (como por ej., empleando arreglo de diodos o espectrometría de masa) pueden ser útiles para demostrar que el pico cromatográfico del analito no incluye a otro componente.

### **Límite de detección**

*Definición* - El límite de detección es la concentración más baja de analito que puede detectarse, pero no necesariamente cuantificarse, en una muestra bajo las condiciones experimentales establecidas.

*Determinación* - Existen diversas maneras para determinar el límite de detección, dependiendo de que se trate de un método no instrumental o instrumental. Pueden emplearse otras aproximaciones a las presentadas a continuación.

Para métodos no instrumentales, el límite de detección es generalmente determinado por el análisis de muestras con concentraciones conocidas de analito y estableciendo el mínimo nivel al cual el analito puede ser detectado en forma confiable. Este procedimiento puede emplearse también para métodos instrumentales.

En el caso de métodos instrumentales que exhiben ruido de fondo, puede emplearse una

aproximación basada en la comparación de las señales medidas con muestras que contienen pequeñas cantidades conocidas de analito con muestras blanco y determinando la relación señal-ruido. Una relación señal ruido de 3:1 ó 2:1 se considera generalmente aceptable para estimar el límite de detección.

Otras aproximaciones se basan en la determinación de la pendiente de la recta de calibración y la desviación estándar de la respuesta.

Cualquiera sea el método empleado, el límite de detección debería ser luego confirmado por medio del análisis de un número apropiado de muestras con concentraciones cercanas o en el límite de detección propuesto.

### **Límite de cuantificación**

*Definición* - El límite de cuantificación es la menor concentración de analito que puede determinarse con precisión y exactitud en una muestra, bajo las condiciones experimentales establecidas. El límite de cuantificación se expresa en las mismas unidades de concentración empleadas para el analito de la muestra.

*Determinación* - Existen diversas maneras para determinar el límite de cuantificación, dependiendo de que se trate de un método no instrumental o instrumental. Pueden emplearse otras aproximaciones a las presentadas a continuación.

Para métodos no instrumentales, el límite de cuantificación es generalmente determinado por el análisis de muestras con concentraciones conocidas de analito y estableciendo el mínimo nivel al cual el analito puede ser cuantificado con precisión y exactitud. Este procedimiento puede emplearse también para métodos instrumentales.

En el caso de métodos instrumentales que exhiben ruido de fondo, puede emplearse una aproximación basada en la comparación de las señales medidas con muestras que contienen pequeñas cantidades conocidas de analito con muestras blanco y determinando la relación señal-ruido. Una relación señal ruido de 10:1 se considera generalmente aceptable para estimar el límite de cuantificación.

Otras aproximaciones se basan en la determinación de la pendiente de la recta de calibración y la desviación estándar de la respuesta.

Cualquiera sea el método empleado, el límite de cuantificación debe ser confirmado por medio del análisis de un número apropiado de muestras con concentraciones cercanas o en el límite de cuantificación propuesto.

### **Linealidad e intervalo**

*Linealidad* - La linealidad de un método analítico es su capacidad de producir resultados

directamente proporcionales a la concentración de analito dentro de un intervalo dado.

En algunos casos puede ser necesaria la aplicación de transformaciones matemáticas para obtener una recta.

*Intervalo* - Se refiere al intervalo de concentraciones de analito que pueden ser determinadas con precisión, exactitud y linealidad. Normalmente, el intervalo se expresa con las mismas unidades que los resultados del ensayo.

*Determinación de linealidad e intervalo* - La linealidad debe establecerse a lo largo del intervalo del método analítico. Se debe establecer por medio de un método estadístico apropiado (como por ej., cálculo de regresión por cuadrados mínimos). En algunos casos, para obtener la proporcionalidad entre los resultados y las concentraciones, los datos deben ser sometidos a una transformación matemática antes del análisis de regresión. Los datos obtenidos a partir de la mejor recta pueden ser útiles para estimar matemáticamente el grado de linealidad. Deben informarse el coeficiente de correlación, la ordenada al origen y la pendiente de la recta de regresión.

El intervalo del método es validado al comprobar que el método analítico es preciso, exacto y lineal, cuando es aplicado a muestras que contienen el analito en los extremos del intervalo así como dentro del mismo.

Para establecer la linealidad se deben investigar un mínimo de cinco concentraciones. También se recomienda considerar los siguientes intervalos:

Para la valoración de una sustancia (o un producto farmacéutico): de 80 a 120 % de la concentración de ensayo.

Para la determinación de una impureza: de 50 a 120 % de la especificación.

Para la determinación de uniformidad de contenido: un mínimo de 70 a 130 % de la concentración de ensayo a menos que se justifique otro intervalo de acuerdo a la naturaleza de la forma farmacéutica.

Para ensayos de disolución:  $\pm 20$  % del intervalo especificado (como por ej., si la especificación para un producto de liberación prolongada cubre una región de 20 %, después de 1 hora, hasta 90 % luego de 24 horas, el intervalo validado debe ser de 0 a 110 % del valor declarado).

### **Robustez**

*Definición* - La robustez de un método analítico es una medida de su capacidad de no verse afectado por variaciones pequeñas, pero deliberadas, en los parámetros del método y proporciona una indicación de su confiabilidad. Ejemplos de variaciones que deben estudiarse durante la

evaluación de la robustez de un método son: diferentes instrumentos, diferentes lotes de reactivos, diferentes tiempos de valoración, diferentes temperaturas de valoración, diferentes columnas cromatográficas (distintos lotes o proveedores), etc. La robustez se expresa normalmente como la falta de influencia de las variables operativas y del entorno sobre los resultados del ensayo.

*Determinación* - La robustez de un método analítico se determina mediante el análisis de alícuotas a partir de lotes homogéneos empleando condiciones operativas y ambientales diferentes pero que están dentro de los parámetros especificados en la valoración. El grado de reproducibilidad de los resultados del ensayo es luego determinado como una función de las variables de la valoración. Esta reproducibilidad puede compararse con la precisión de la valoración bajo condiciones normales para obtener de una medida de la robustez del método analítico.

#### DATOS REQUERIDOS PARA LA VALIDACION DE UN METODO ANALITICO

Los métodos analíticos descritos en esta Farmacopea varían desde determinaciones analíticas complejas hasta la evaluación subjetiva de ciertas características, para los cuales se requieren diferentes esquemas de validación. Las categorías de métodos analíticos más comunes son las siguientes:

CATEGORÍA I - Incluye los métodos analíticos para la cuantificación de los componentes mayoritarios de las materias primas o de los

principios activos (incluyendo conservantes) en productos farmacéuticos.

CATEGORÍA II - Incluye los métodos analíticos empleados para la determinación de impurezas en las materias primas o productos de degradación en los productos farmacéuticos. Estos métodos incluyen valoraciones cuantitativas y ensayos límites.

CATEGORÍA III - Incluye métodos analíticos para la determinación de las características de desempeño (como por ej., disolución, liberación de principios activos).

CATEGORÍA IV - Incluye ensayos de identificación.

Para cada categoría de análisis, se necesita diferente información analítica. En la *Tabla* se indican los elementos que normalmente se requieren para cada una de estas categorías.

Las valoraciones y ensayos generales ya establecidos (por ej., método volumétrico para la determinación de agua, ensayo de endotoxinas bacterianas) deben también validarse para comprobar su exactitud (y ausencia de posibles interferencias) cuando se emplea para un producto o materia prima nuevos.

La validez de un método analítico puede comprobarse sólo mediante estudios de laboratorio. En consecuencia, la documentación que avale tales estudios es un requisito básico para determinar si un método es apropiado para una aplicación determinada. Cualquier método analítico propuesto debe estar acompañado de la documentación necesaria.

**Tabla.** Datos requeridos para la validación de un método analítico.

Característica	Categoría I	Categoría II		Categoría III	Categoría IV
		Cuantitativo	Ensayo límite		
Exactitud	+	+	*	*	-
Presición					
Repetibilidad	+	+	-	+	-
Precisión Interm.	+	+	-	+	-
Especificidad	+	+	+	*	+
Lím. de detección	-	-	+	*	-
Lím. de de cuantificación	-	+	-	*	-
Linealidad	+	+	-	*	-
Intervalo	+	+	*	*	-

\* Puede requerirse según la naturaleza del ensayo