

# **Validação, Verificação e Transferência de Métodos Analíticos**

Rafael Finocchiaro Maranhão

SCD Executive - United States Pharmacopeia



Last Update: April 2022

USP Subject Matter Expert

Course ID: CM-1225-04

# Disclaimer



Because USP text and publications may have legal implications in the U.S. and elsewhere, their language must stand on its own. The USP shall not provide an official ex post facto interpretation to one party, thereby placing other parties without that interpretation at a possible disadvantage. The requirements shall be uniformly and equally available to all parties.

In addition, USP shall not provide an official opinion as to whether a particular article does or does not comply with compendial requirements, except as part of an established USP verification or other conformity assessment program that is conducted separately from and independent of USP's standard-setting activities.

Certain commercial equipment, instruments or materials may be identified in this presentation to specify adequately the experimental procedure. Such identification does not imply approval, endorsement, or certification by USP of a particular brand or product, nor does it imply that the equipment, instrument or material is necessarily the best available for the purpose or that any other brand or product was judged to be unsatisfactory or inadequate.

This course material is USP Property. Duplication or distribution without USP's written permission is prohibited.

USP has tried to ensure the proper use and attribution of outside material included in these slides. If, inadvertently, an error or omission has occurred, please bring it to our attention. We will in good faith correct any error or omission that is brought to our attention. You may email us at: [legal@usp.org](mailto:legal@usp.org).

# Instructor Name



**USP Affiliation:** USP Subject Matter Expert – USP Education  
**Title:** SCD Executive  
**Company:** United States Pharmacopeia  
**Education:** BSc, MSc, Specialist

Biochemical Technician from ETECAP, Bachelor in Pharmacy-Biochemistry and Master in Chemical Technology from the University of São Paulo, and Specialist in Sustainability from Fundação Getulio Vargas. He has more than 20 years of experience in pharmaceutical research, production and analysis, working with quality management, analytical development, pharmaceutical product development, characterization, production of Reference Standards, technical support for Industry, Regulatory Agencies and stakeholder.

Since 2008 at USP, he has worked in the Reference Standards Laboratory, analytical development, compendial monograph modernization and Reference Standards planning, evaluation and production. He currently works with Technical Support and Customer Engagement, promotion and communication on USP products, services and solutions for the manufacture and analysis of medicines, foods and dietary supplements, as well as initiatives and projects focused on operational efficiency, sustainability and innovation.

# Limite de Detecção e Limite de Quantificação



## Definições

- ▶ **USP <1225>**: “(...)It is the lowest amount of analyte in a sample that can be detected, but not necessarily quantitated, under the stated experimental conditions. Thus, limit tests merely substantiate that the amount of analyte is above or below a certain level.(...)”.
- ▶ **ICH Q2(R1) – Detection Limit**: “The detection limit of an individual analytical procedure is the lowest amount of analyte in a sample which can be detected but not necessarily quantitated as an exact value”.
- ▶ **Draft ICH Q2(R2) – Working Range**: “The detection limit is the lowest amount of an analyte in a sample which can be detected but not necessarily quantitated as an exact value”.
- ▶ **Anvisa - RDC N° 166 / 2017**: “O limite de detecção deve ser demonstrado pela obtenção da menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém, não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas”.

### E sobre a expressão “Reliably detected”?

USP e ICH fazem referência à expressão “*reliably detected*”, mas não explicam sua definição. Em princípio, isto significa a capacidade de obter um sinal reprodutível e de confiança para o analito. Pode ser definido quando apropriado.

## Definições

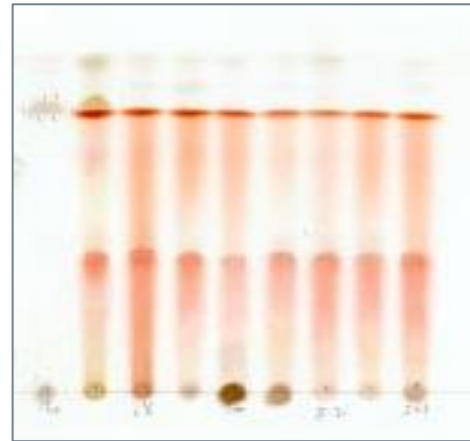
- ▶ **USP <1225>**: “(...)the lowest amount of analyte in a sample that can be determined with acceptable Precision and Accuracy under the stated experimental conditions(...)”.
- ▶ **ICH Q2(R1) – Quantitation Limit**: “(...)the minimum level at which the analyte can be quantified with acceptable accuracy and precision”.
- ▶ **Draft ICH Q2(R2) – Working Range**: “The quantitation limit is the lowest amount of analyte in a sample which can be quantitatively 526 determined with suitable precision and accuracy. The quantitation limit for an analytical 527 procedure should not be more than the reporting threshold.(...)”
- ▶ **ANVISA RDC N° 166 / 2017**: “é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas”.
- ▶ **Premissas:**
  - **O Limite de Quantificação deve ser coerente com o limite de especificação das impurezas**: só é aceitável que o limite de quantificação seja menor que o limite de especificação das impurezas. Só assim as impurezas podem ser quantificadas com exatidão e precisão adequadas e controladas apropriadamente.
  - **Precisão e Exatidão comprovadas**: tanto para métodos instrumentais quanto para não instrumentais, o Limite de Quantificação é determinado pela análise de amostras contendo nível mínimo apropriado do analito, quantificadas com exatidão e precisão apropriadas.
  - **Relação Sinal/Ruído**: pode ser estimado pela concentração do analito que resulta em um valor para a relação sinal/ruído de 10:1.

O valor estimado para o Limite de Quantificação deve ser validado empiricamente, e a Precisão e a Exatidão devem ser determinadas na concentração correspondente a este limite.

# Limite de Detecção

## USP-NF <1225> - Métodos não instrumentais

Cromatografia em camada delgada com derivatização sob luz branca



- ▶ O método deve ser reproduzido com amostras com quantidade conhecida do analito para estabelecer a menor concentração na qual pode ser detectado com confiança.
- ▶ Os métodos não instrumentais são baseados em detecção visual.

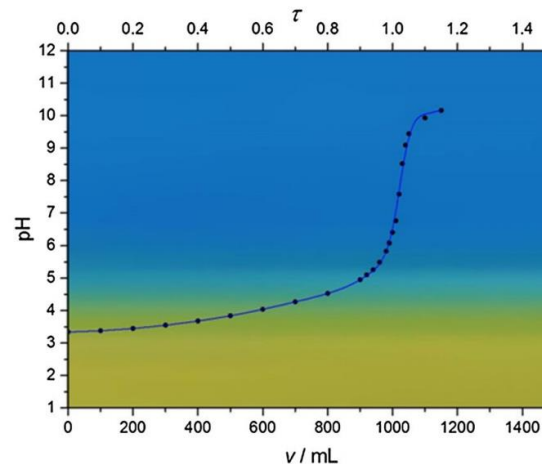
Exemplos:

- Cromatografia em camada delgada
- Titulação colorimétrica
- Comparação de cor
- Turvação
- Precipitação

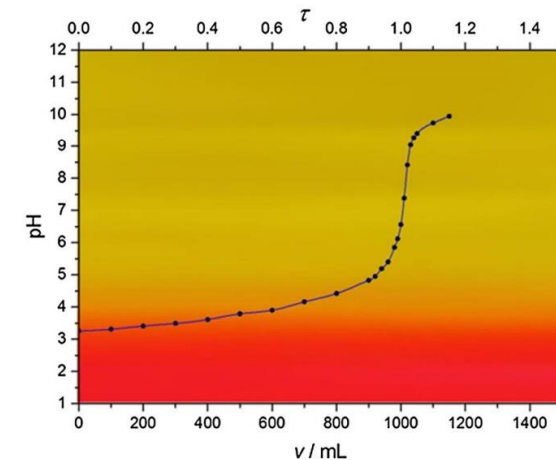
Teste de turvação



Titulação colorimétrica com indicador Bromocresol green



Titulação colorimétrica com indicador methyl orange



## USP-NF <1225> - Métodos instrumentais

- ▶ Um aspecto fundamental na determinação do limite de detecção para métodos instrumentais é o ruído na linha de base. Quanto maior o ruído, mais desafiador é para o método detectar baixas concentrações do analito.
  - **Exemplos:** HPLC, GC, absorção atômica.
- ▶ Podemos utilizar os seguintes métodos para estimativa do Limite de Detecção:
  1. Determinar a concentração do analito que resulta em relação sinal/ruído (S/N) de 2:1 ou 3:1
  2. Pelo coeficiente angular da curva de calibração
  3. Desvio padrão de determinadas respostas do sistema

Qualquer valor estimado de Limite de Detecção estimado pelos métodos acima deve ser subsequentemente validado através da análise de um número apropriado de amostras preparadas no nível estimado. O valor estimado deve ser consistente com os resultados obtidos. É considerado validado o valor empírico.



# Limite de Detecção

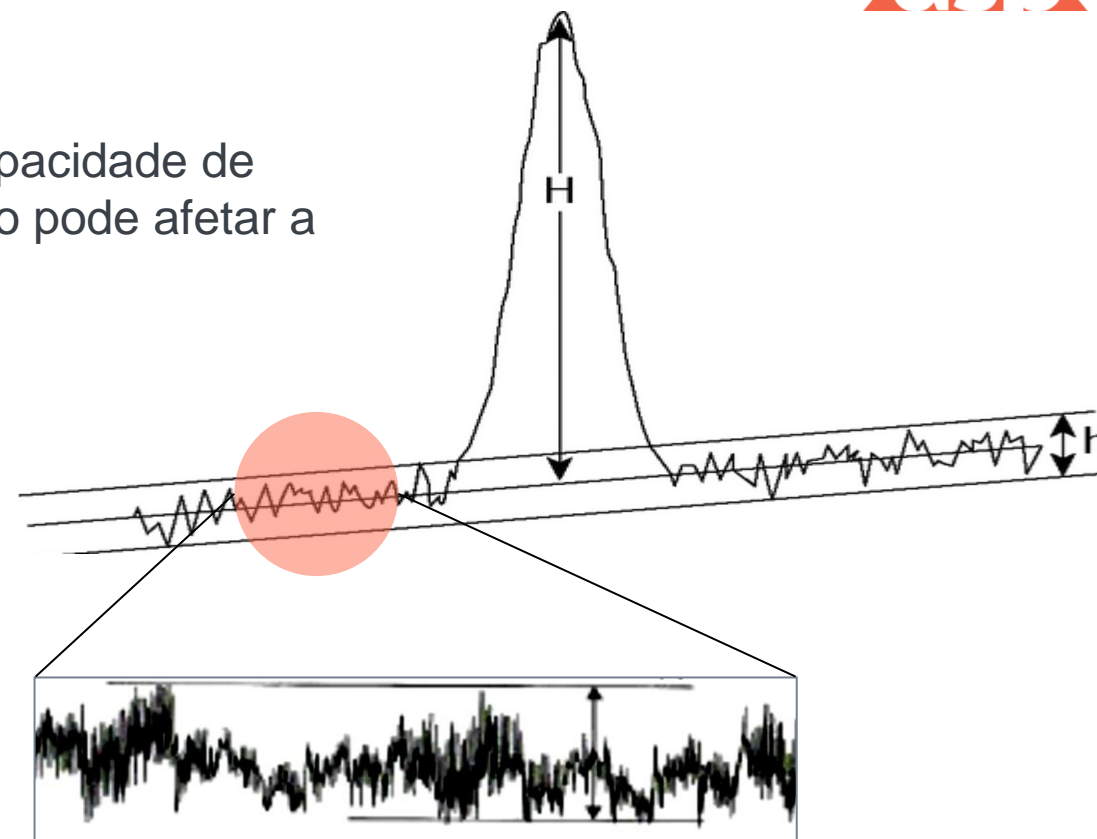
## USP-NF <621> - Relação sinal/ruído (S/N)

A relação sinal/ruído é um parâmetro útil para verificar a capacidade de detecção e adequabilidade do sistema, uma vez que o ruído pode afetar a precisão e exatidão do método.

É calculado através da altura do pico (H) e da amplitude do ruído (h).

**H** = medido do ápice do pico até a linha de base, que é extrapolada ao longo de 5 vezes a largura do pico à meia-altura.

**h** = calculado pela diferença entre os pontos de maior e menor amplitude do ruído, no mesmo intervalo de 5 vezes a largura à meia-altura do pico de interesse. Se possível, fazer esta medição ao redor do pico de interesse, para melhor representatividade.



$$S/N = \frac{2H}{h}$$

**OFFICIAL**  
USP-NF  
DOI Ref: kw6y4

# Limite de Detecção



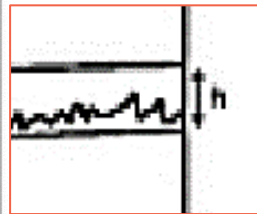
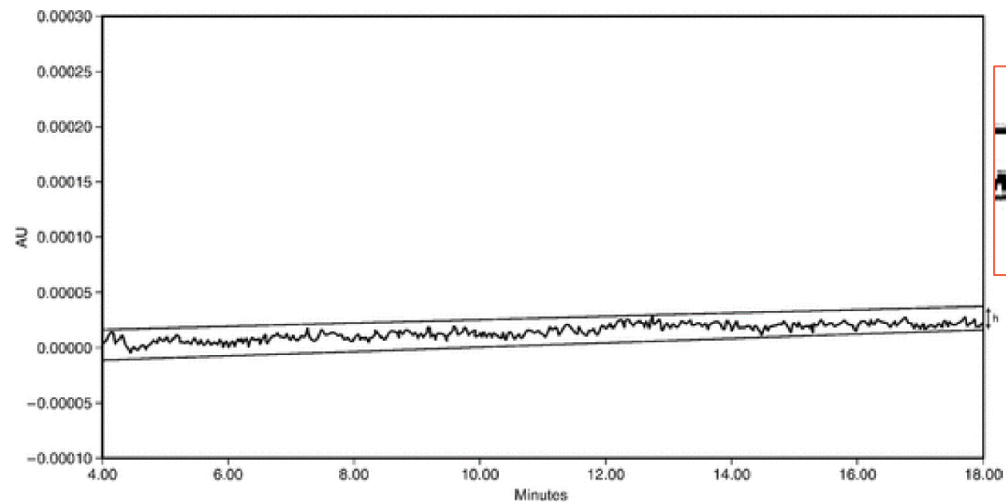
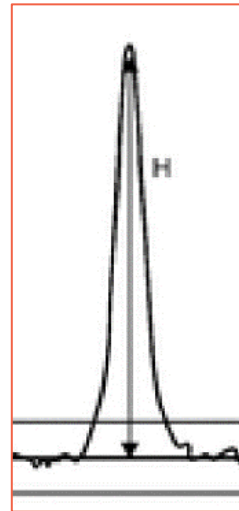
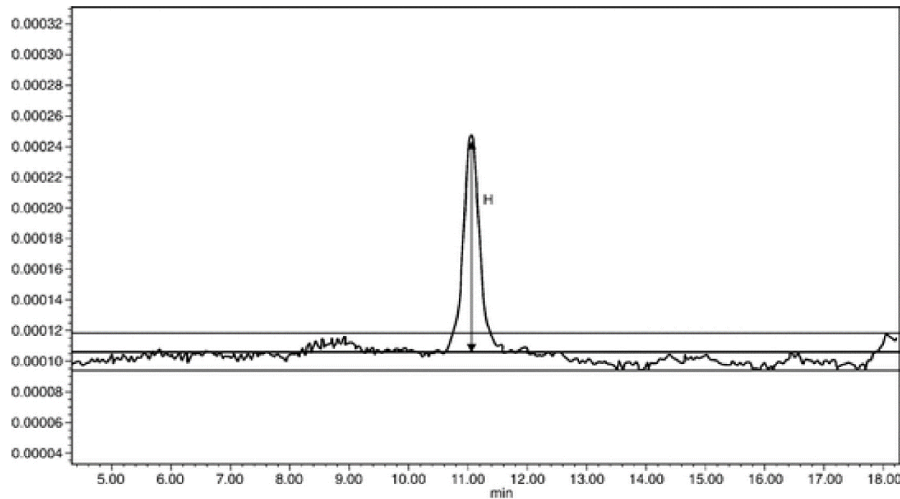
## USP-NF <621> - Relação sinal/ruído (S/N)

**H** = medido do ápice do pico até a linha de base, que é extrapolada ao longo de 20 vezes a largura do pico à meia-altura.

**h** = calculado pela diferença entre os pontos de maior e menor amplitude do ruído em uma injeção do branco (diluyente), no mesmo intervalo de 20 vezes a largura à meia-altura do pico de interesse. Se possível, fazer esta medição ao redor do tempo de retenção do pico de interesse, para melhor representatividade.

**NOT YET OFFICIAL**  
**USP-NF**  
**DOI Ref: po2zh**

$$S/N = \frac{2H}{h}$$



# Limite de Detecção



ICH Q2(R1) - Relação sinal/ruído (S/N)

ICH Q2(R1) - Utilizando o desvio padrão de respostas ( $\sigma$ ) e o coeficiente angular da reta (Slope, S)

$$DL = \frac{3.3 \sigma}{S}$$

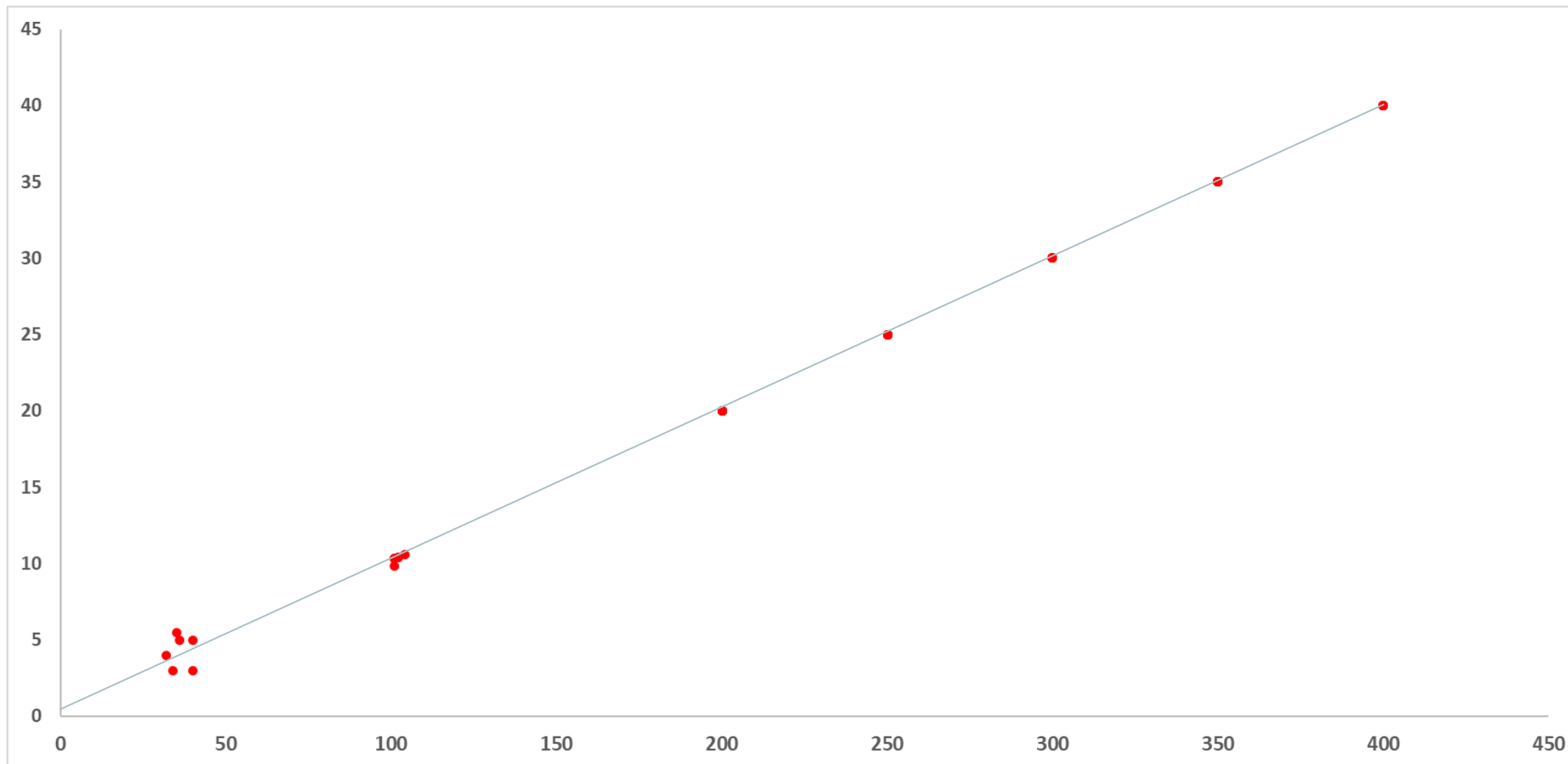
▶ Onde:

- $\sigma$  = desvio padrão das respostas
  - $\sigma$  das respostas do Branco na região do tempo de retenção do pico de interesse
  - $\sigma$  dos resíduos das respostas (sob a curva de calibração)
  - $\sigma$  do coeficiente linear (intercepto) de múltiplas curvas de calibração (região do suposto Limite de Detecção)
- S = coeficiente angular da curva de calibração

# Limite de Detecção



Utilizando o desvio padrão de respostas (s) e o coeficiente angular da curva (b)

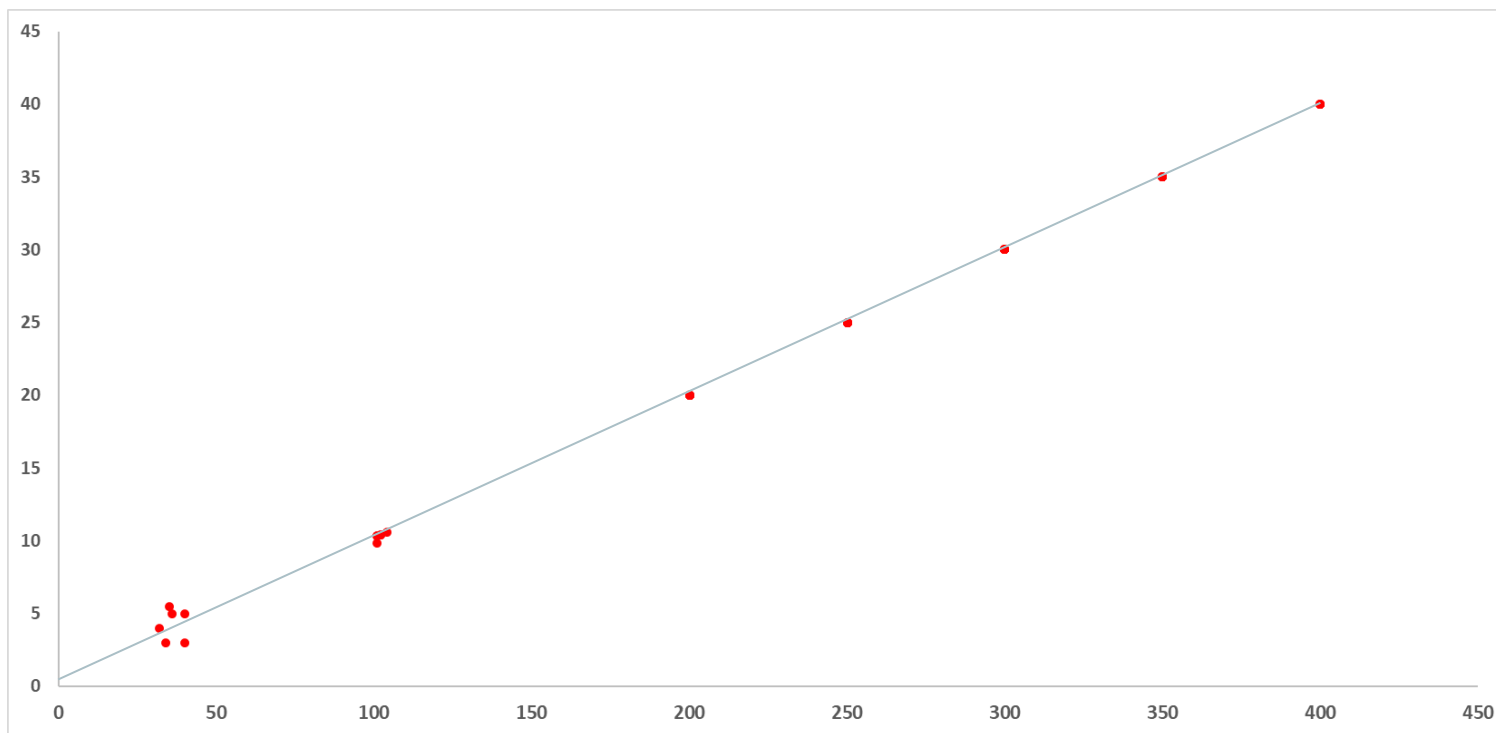


Nível	X	Y
A	$X_{A1}$	$Y_{A1}$
	$X_{A6}$	$Y_{A6}$
B	$X_{B1}$	$Y_{B1}$
	$X_{B6}$	$Y_{B6}$
C	$X_{C1}$	$Y_{C1}$
	$X_{C6}$	$Y_{C6}$
D	$X_{D1}$	$Y_{D1}$
	$X_{D6}$	$Y_{D6}$
E	$X_{E1}$	$Y_{E1}$
	$X_{E6}$	$Y_{E6}$
F	$X_{F1}$	$Y_{F1}$
	$X_{F6}$	$Y_{F6}$
G	$X_{G1}$	$Y_{G1}$
	$X_{G6}$	$Y_{G6}$

# Limite de Detecção



Utilizando o desvio padrão de respostas (s) e o coeficiente angular da curva (b)



Nível	X	Y
A	$X_{A1}$	$Y_{A1}$
	$X_{A6}$	$Y_{A6}$
B	$X_{B1}$	$Y_{B1}$
	$X_{B6}$	$Y_{B6}$
C	$X_{C1}$	$Y_{C1}$
	$X_{C6}$	$Y_{C6}$
D	$X_{D1}$	$Y_{D1}$
	$X_{D6}$	$Y_{D6}$
E	$X_{E1}$	$Y_{E1}$
	$X_{E6}$	$Y_{E6}$
F	$X_{F1}$	$Y_{F1}$
	$X_{F6}$	$Y_{F6}$
G	$X_{G1}$	$Y_{G1}$
	$X_{G6}$	$Y_{G6}$

$$y_i = a + bx_i + e_i$$

$$b = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

$$a \rightarrow x = 0$$

$$s^2 = \frac{\sum_{i=1}^N (y_i - \bar{y})^2}{(N - 1)}$$

$$s = \sqrt{s^2}$$

# Limite de Quantificação



## USP-NF <1225> - Relação sinal/ruído (S/N)

- ▶ Uma relação sinal/ruído aceitável para o Limite de Quantificação é de 10:1.

## ICH Q2(R1) - Utilizando o desvio padrão de respostas ( $\sigma$ ) e o coeficiente angular da reta (Slope, S)

$$QL = \frac{10\sigma}{S}$$

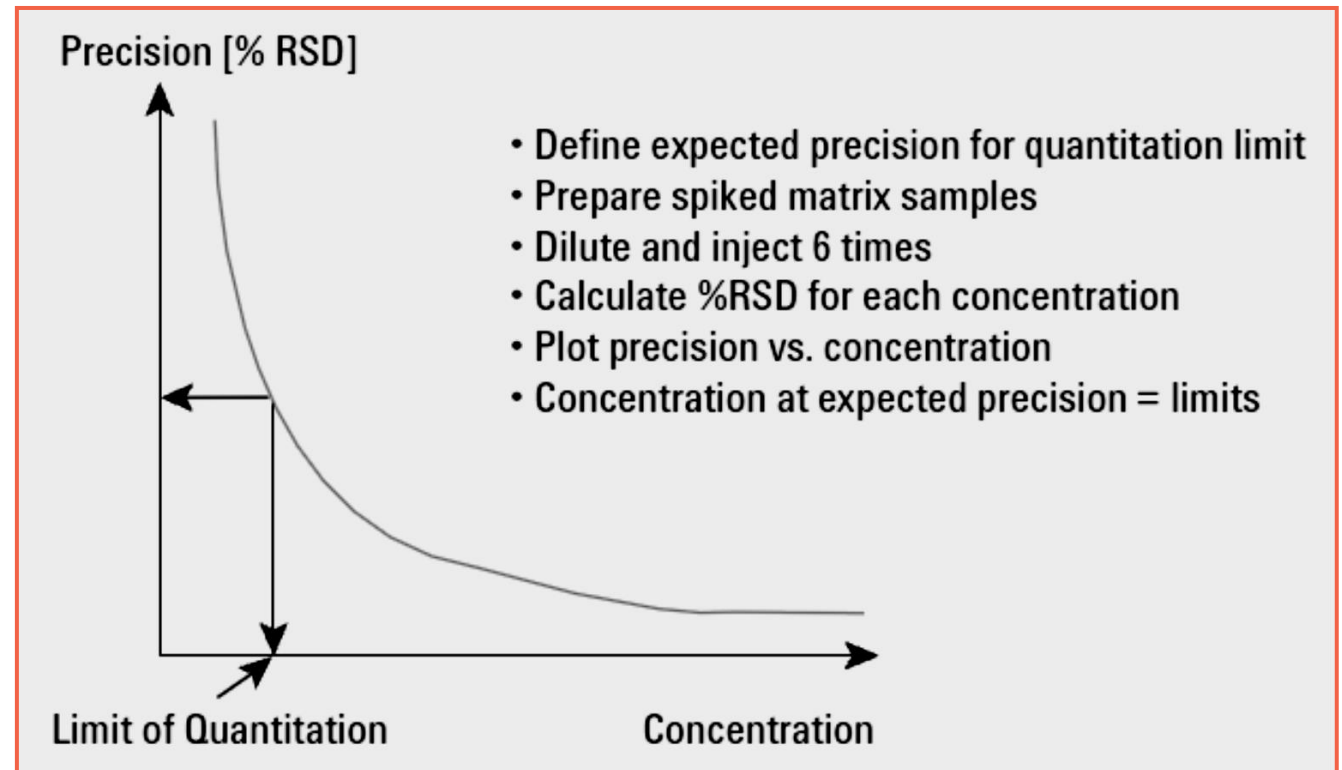
- ▶ Onde:

- $\sigma$  = desvio padrão das respostas
  - $\sigma$  das respostas do Branco na região do tempo de retenção do pico de interesse
  - $\sigma$  dos resíduos das respostas (sob a curva de calibração)
  - $\sigma$  do coeficiente linear (intercepto) de múltiplas curvas de calibração (região do suposto Limite de Detecção)
- S = coeficiente angular da curva de calibração

# Limite de Quantificação

## Limite de Quantificação estimado pelo critério da Precisão

- ▶ Uma vez que o requerimento para a definição do Limite de Quantificação é haver Precisão e Exatidão adequadas, é possível estimá-lo de forma mais apropriada através da análise da Precisão, avaliando a repetibilidade de determinações em diversas concentrações diferentes.
- ▶ A concentração correspondente à Precisão mínima aceitável é um bom estimador do Limite de Quantificação, que pode então ser validado através da comprovação da Exatidão no mesmo ponto.

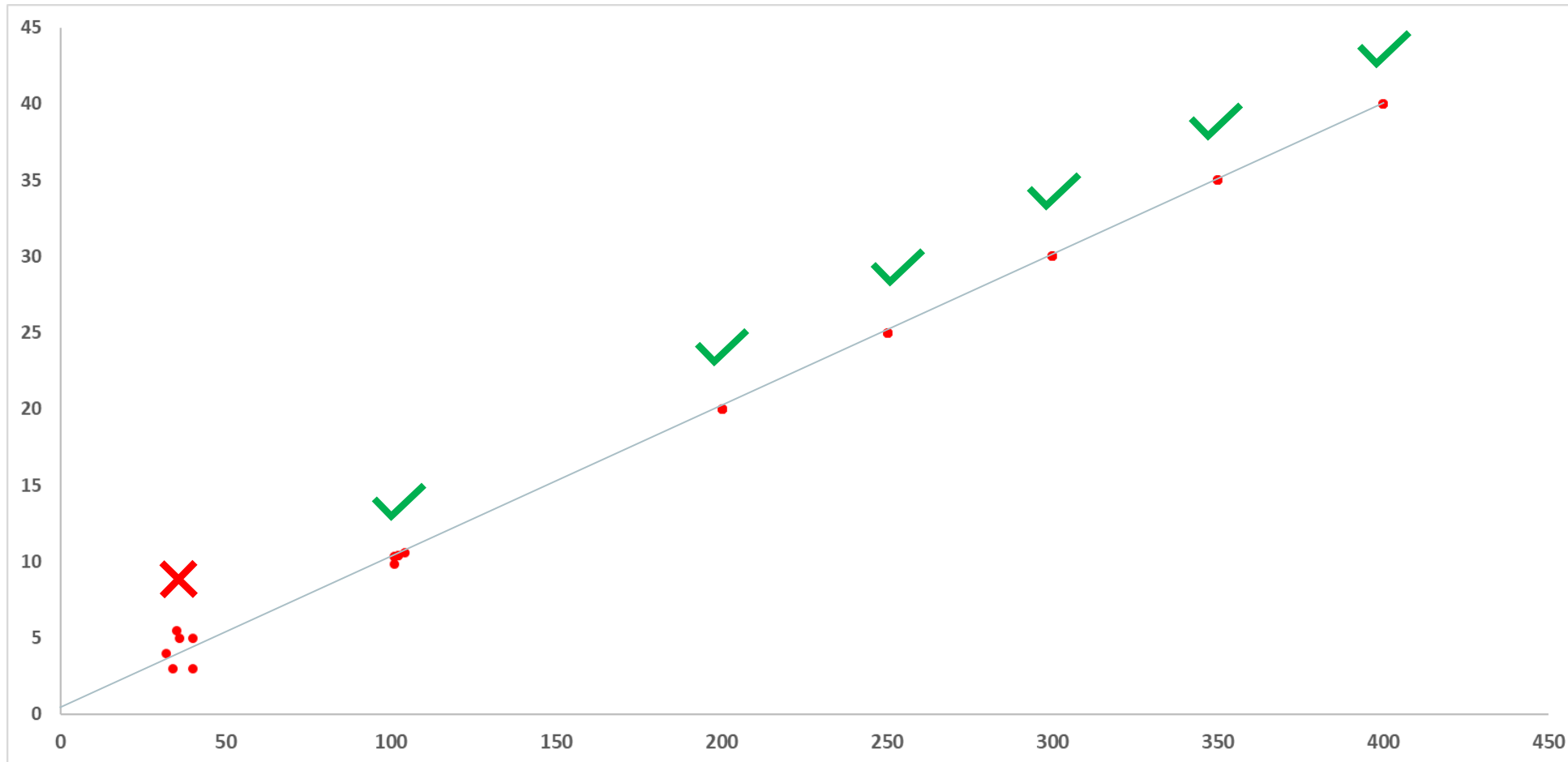




# Limite de Quantificação



## Utilizando o conceito de Precisão e Exatidão



Nível	X	Y
A	$X_{A1}$	$Y_{A1}$
	$X_{A6}$	$Y_{A6}$
B	$X_{B1}$	$Y_{B1}$
	$X_{B6}$	$Y_{B6}$
C	$X_{C1}$	$Y_{C1}$
	$X_{C6}$	$Y_{C6}$
D	$X_{D1}$	$Y_{D1}$
	$X_{D6}$	$Y_{D6}$
E	$X_{E1}$	$Y_{E1}$
	$X_{E6}$	$Y_{E6}$
F	$X_{F1}$	$Y_{F1}$
	$X_{F6}$	$Y_{F6}$
G	$X_{G1}$	$Y_{G1}$
	$X_{G6}$	$Y_{G6}$

# Validação, Verificação e Transferência de Métodos Analíticos



# Discussion



**Empowering a healthy tomorrow**

**USP Education**