

# 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.

# **USP-NF <1210> *Statistical Tools for Procedure Validation***



## Introdução

- Descreve a utilização de abordagens estatísticas para validação de métodos de acordo com o Capítulo Geral <1225>;
- Descreve como estabelecer critérios estatísticos de performance para Exatidão, Precisão e Limite de Detecção;
- As outras etapas da Validação de Métodos Analíticos como Seletividade, Robustez e Linearidade não estão contemplados neste capítulo.

Terminologia	Descrição
Laboratory sample	O material recebido pelo laboratório
Analytical sample	O material gerado por qualquer tratamento do laboratory sample, como pulverização ou homogeneização
Test portion	A quantidade (alíquota) de material tirado da Analytical sample para teste
Test solution	A solução resultante da manipulação laboratorial da Test Portion como a derivatização química do analito ou diluição do Test Portion
Individual determination (ID)	O valor medido para uma unidade da Test Solution
Reportable value	Média das leituras de uma ou mais unidades da Test Solution

Terminologia	Descrição			
Laboratory sample	100 comprimidos revestidos			
Analytical sample	20 comprimidos são retirados da laboratory sample e pulverizados com gral e pistilo			
Test portion	<b>Replicata 1:</b> um grama de pó pulverizado da Analytical sample		<b>Replicata 2:</b> um grama de pó pulverizado da Analytical sample	
Test solution	<b>Replicata 1:</b> Test portion é dissolvida em 1L de solvente		<b>Replicata 2:</b> Test portion é dissolvida em 1L de solvente	
Individual determination (ID)	<b>ID 1 da replicata 1:</b> test solution	<b>ID 2 da replicata 1:</b> test solution	<b>ID 1 da replicata 2:</b> test solution	<b>ID 2 da replicata 2:</b> test solution
Reportable value	Resultado médio das quatro determinações individuais			

# Métodos para estimar a Exatidão e a Precisão



O seguinte modelo é utilizado para representar um valor reportável:

$$Y = \tau + \beta + \varepsilon$$

$Y$  = um valor reportável

$\tau$  = valor verdadeiro ou aceito como referência

$\beta$  = bias sistemático do método

$\varepsilon$  = erro randômico



- Média de  $(Y - \tau)$
- Devemos estimar o bias sistemático ( $\beta$ )

O Capítulo Geral USP <1225> define que um procedimento de referência ou um método bem caracterizado pode ser utilizado para determinar o valor de  $\tau$

Para estimar o bias  $\beta$ :

$$\beta = Y - \tau$$

$\beta$  = bias sistemático

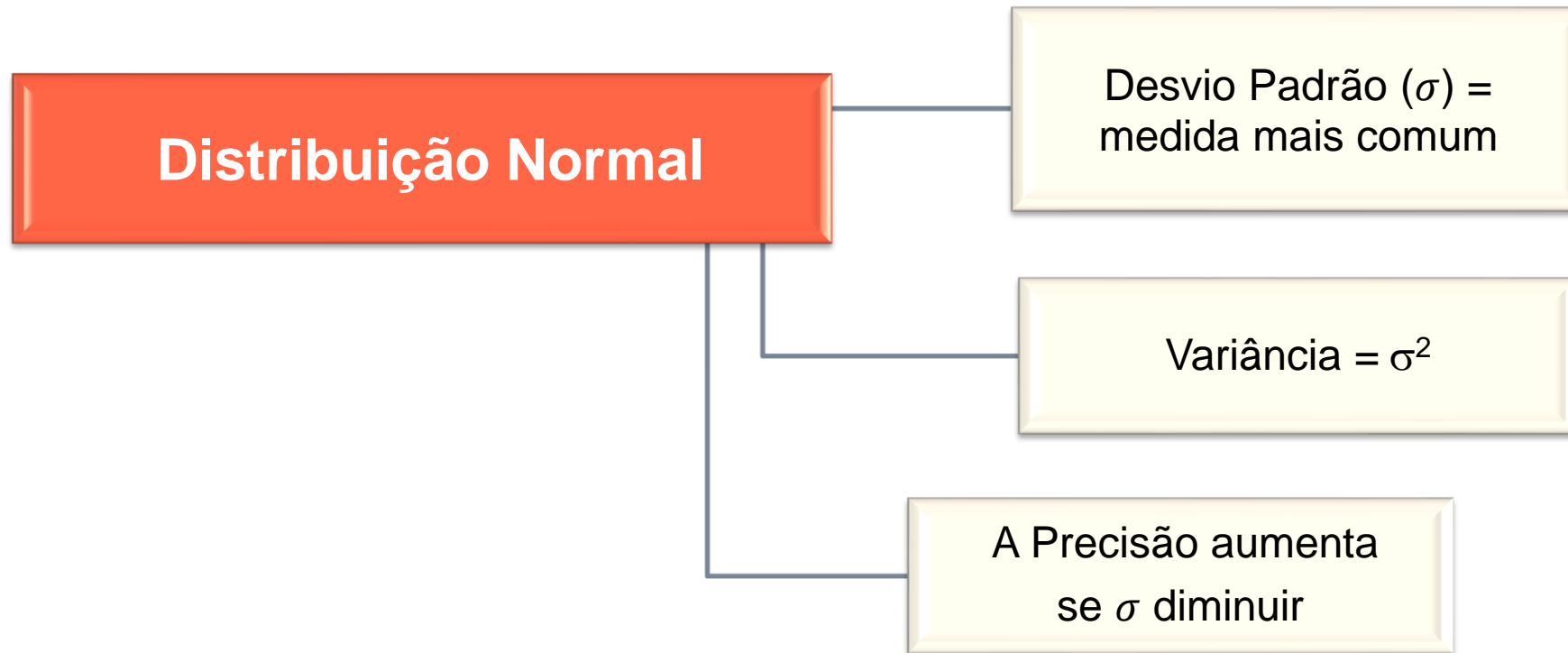
$\bar{Y}$  = média pra a amostra

$\tau$  = valor verdadeiro

# Precisão



Muitos testes estatísticos se baseiam no uso da distribuição normal, em que  $\sigma$  descreve a variabilidade.



# Métodos para estimar a Precisão e Exatidão



Concentração (%)	Test Solution	Valor reportado (mg/g)
50	1	996,07
50	2	988,43
50	3	995,90
100	4	987,22
100	5	990,53
100	6	999,39
150	7	996,33
150	8	993,67
150	9	987,76

Média ( $\bar{Y}$ )	992,81
Desvio Padrão (S)	4,44

O Intervalo de confiança com nível  $100(1-2\alpha)\%$  para o bias ( $\beta$ ) é:

$$(\bar{Y} - \tau) \pm t_{1-\alpha;n-1} \frac{S}{\sqrt{n}}$$

$\beta$  = Intervalo de confiança com nível  $100(1 - 2\alpha)\%$  para o bias

$S$  = precisão intermediária

$n$  = número de valores reportados

$t_{1-\alpha;n-1}$  = o percentil de uma distribuição t de Student com área  $1-\alpha$  à esquerda e  $n-1$  graus de liberdade

## Exemplo:

Se  $\alpha = 0.05$  e  $n = 9$ , então:  $t_{0,95;8} = 1,860$

- ▶ Calculando o Intervalo de confiança com nível  $100(1-2\times 0.05)\% = 90\%$  para o bias  $\beta$ :

$$(\bar{Y} - \tau) \pm t_{1-\alpha;n-1} \frac{S}{\sqrt{n}}$$

$$(992,81 - 1000) \pm 1,86 \frac{4,44}{\sqrt{9}}$$

$$[-9,94 \text{ to } -4,44] \text{ mg/g}$$

O limite para  $\sigma$  com nível de confiança  $100(1-\alpha)\%$  é:

$$U = S \sqrt{\frac{n-1}{\chi_{\alpha;n-1}^2}}$$

$U$  = limite para  $\sigma$  com nível  $100(1-\alpha)\%$  de confiança

$S$  = precisão intermediária

$n$  = número de valores reportados

$\chi_{\alpha;n-1}^2$  = percentil de uma distribuição qui-quadrado com área  $\alpha$  à esquerda e  $n-1$  graus de liberdade

# Estimando a Exatidão e Precisão



## Exemplo:

Se  $\alpha = 0.05$  e  $n = 9$ , então:  $\chi_{0,05;8}^2 = 2,73$

- ▶ Calculando o limite para  $\sigma$  com nível de confiança  $100(1-0,05)\% = 95\%$ :

$$U = S \sqrt{\frac{n-1}{\chi_{\alpha;n-1}^2}}$$

$$U = 4,44 \sqrt{\frac{9-1}{2,73}} = 7,60 \text{ mg/g}$$

Na validação de um método analítico para seu uso pretendido, frequentemente é útil considerar o impacto conjunto do bias e da precisão. O grau em que  $\beta$  impacta na adequabilidade do uso do método analítico depende em parte de  $\sigma$ .

O grau em que  $\beta$  impacta a adequabilidade de um método analítico depende em parte de  $\sigma$ .

**Critério:**

$$\Pr(-\lambda < Y - \tau < \lambda) \geq P$$

*ou*

$$\Pr(-\lambda + \tau < Y < \lambda + \tau) \geq P$$

$Pr$  = probabilidade

$Y$  = um valor reportável

$\tau$  = valor de referência (teórico ou verdadeiro)

$P$  = probabilidade desejada

$\lambda$  = limite



# Avaliação combinada de Precisão e Exatidão



- ▶ Podemos tirar duas conclusões desta forma de avaliação:
  - A probabilidade que o **próximo valor** reportável caia dentro da faixa aceitável (I)
    - Um **Intervalo de predição** é usado para validar essa hipótese
  - A probabilidade que **todos os futuros valores** reportáveis caiam dentro da faixa aceitável (II)
    - Um **Intervalo de tolerância** é usado para validar essa hipótese

Pelo fato da inferência associada com o **intervalo de tolerância** ser relacionada com um conjunto de valores maior, ele é sempre maior que o **intervalo de predição**.



# Avaliação combinada de Precisão e Exatidão



O intervalo de predição é calculado por:

$$\bar{Y} \pm t_{\frac{1+P}{2}; n-1} S \sqrt{1 + \frac{1}{n}}$$

$\bar{Y}$  = média dos valores

$t_{(1+P)/2; n-1}$  = percentil da distribuição t de Student com área  $(1+P)/2$  à esquerda e  $(n-1)$  graus de liberdade

$S$  = precisão intermediária

É a probabilidade que o **próximo valor** reportável caia dentro da faixa aceitável!

# Avaliação combinada da Precisão e Exatidão



- ▶ Com  $P = 0,90$  , o intervalo de predição é calculado por:

$$\bar{Y} \pm t_{\frac{1+P}{2}; n-1} S \sqrt{1 + \frac{1}{n}}$$

$$992,81 \pm 1,86 * 4,44 \sqrt{1 + \frac{1}{9}}$$

$$[984,1 \text{ a } 1001,5] \text{ mg/g}$$

# Avaliação combinada da Precisão e Exatidão



O intervalo de tolerância com nível de  $100(1-\alpha)\%$  de confiança é calculado por:

$$\bar{Y} \pm K * S$$

$$K = \sqrt{\frac{Z_{\frac{1+P}{2}}^2 * (n - 1)}{\chi_{\alpha;n-1}^2} * \left(1 + \frac{1}{n}\right)}$$

$\bar{Y}$  = médias dos valores

$S$  = precisão intermediária

$Z_{\frac{(1+P)}{2}}^2$  = quadrado do percentil da distribuição normal com área  $(1 + P)/2$  à esquerda

$n$  = número de valores reportados

$\chi_{\alpha;n-1}^2$  = percentil da distribuição qui-quadrado com área  $\alpha$  à esquerda e  $(n-1)$  graus de liberdade

É a probabilidade que **todos os próximos valores** reportáveis caiam dentro da faixa aceitável!

# Avaliação combinada da Precisão e Exatidão



- ▶ Com  $1 - \alpha = 0,90$  e  $P = 0,90$ , o intervalo de tolerância é calculado por:

$$K = \sqrt{\frac{Z_{+P}^2 * (n - 1)}{\frac{2}{\chi_{\alpha;n-1}^2}} * \left(1 + \frac{1}{n}\right)}$$

$$K = \sqrt{\frac{1,64^2 * (9 - 1)}{3,49} * \left(1 + \frac{1}{9}\right)} = 2,63$$

$$Y \pm K * S$$

$$992,81 \pm 2,63 * 4,44$$

$$[981,2 \text{ a } 1004,5] \text{ mg/g}$$

# Avaliação combinada da Precisão e Exatidão



- ▶ Se os intervalos de confiança calculados caem dentro da faixa determinada para  $(-\lambda + \tau)$  a  $(\lambda + \tau)$ , o critério é satisfeito e o método analítico está validado para Exatidão e Precisão.
- ▶ Resultados para o exemplo:
  - **Intervalo de predição:** 984,1 a 1001,5 mg/g
    - 90% de confiança que o próximo valor reportável estará contido nesta faixa
  - **Intervalo de tolerância:** 981,2 a 1004,5 mg/g
    - 90% de confiança que 90% dos futuros valores reportáveis estarão contidos nesta faixa

Suponhamos que o critério é projetado para garantir que a diferença entre  $Y$  e  $\tau$  deve ser menor que 2% e  $\tau$  com probabilidade de  $P = 0.90$ . Então:

$$\begin{aligned} -\lambda + \tau &= \tau(-0,02 + 1) = 1000(0,98) = 980 \text{ mg/g} \\ \tau + \lambda &= \tau(1 + 0,02) = 1000(1,02) = 1020 \text{ mg/g} \end{aligned}$$

**Uma vez que ambos os intervalos estão contidos no intervalo de especificação 980 a 1020 mg/g, consideramos o método analítico validado para exatidão e precisão.**

# Discussion



**Empowering a healthy tomorrow**

**USP Education**