

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.

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.

Verificação de Sistemas Cromatográficos



Verificação da adequabilidade do sistema cromatográfico

Este processo, denominado **System Suitability** em referências compendiais, tem o objetivo de evidenciar que o equipamento e o método analítico estão operando de forma a fornecer resultados confiáveis para aquela corrida analítica.

O equipamento, seus componentes eletrônicos, as operações analíticas e as amostras a serem analisadas constituem um sistema que deve ser avaliado em seu conjunto, e que deve ser monitorado durante todo o intervalo da corrida analítica para comprovar o atendimento aos requerimentos, da primeira à última amostra.

Fatores que podem contribuir para a variabilidade do sistema cromatográfico:

- Configuração e montagem do sistema cromatográfico**
- Vazão da fase móvel**
- Dimensões da coluna, temperatura do forno, pressão**
- Composição e pH da fase móvel**
- Características da fase estacionária: partícula ou monolítica, porosidade, área superficial específica**
- Tratamento da fase estacionária: *endcapping*, *carbon loading***

Verificação da adequabilidade do sistema cromatográfico

Soluções envolvidas: depende do método analítico. Podem ser utilizadas a Solução Padrão, ou uma solução específica para o *System Suitability* contendo diversos compostos, ou outra solução que seja conveniente.

Em geral, envolve avaliação de parâmetros relativo aos compostos de interesse do teste específico.

Alguns parâmetros que podem ser utilizados para avaliação de System Suitability para métodos cromatográficos:

- Tempo de retenção (t_R)
- Resolução (R_s)
- Número de pratos teóricos (N)
- Repetibilidade do sistema (expresso em Desvio Padrão Relativo, %RSD)
- Fator de Simetria (A_s)
- Razão sinal/ruído (S/N)
- Limite de Quantificação (LQ)
- Fator de retenção (k) ou Fator de capacidade (k')

Verificação da adequabilidade do sistema cromatográfico

Aspectos importantes para determinar os critérios de *System Suitability* para seu método:

- ❑ **Balço entre teoria e prática:** deve ser rígido o suficiente para assegurar a qualidade dos resultados, mas não restritiva demais para que sistemas aceitáveis sejam rejeitados e criem dificuldades na rotina;
- ❑ **Confiabilidade:** deve refletir desempenho mínimo aceitável para gerar resultados confiáveis. As informações sobre os efeitos causados pelos fatores principais do método durante o desenvolvimento do método e o efeito nos critérios de validação (principalmente nos estudos de robustez) são fundamentais para estabelecer essa relação;
- ❑ **Escolha dos parâmetros:** deve-se avaliar as condições cromatográficas para as quais o método é mais sensível;
- ❑ **Crítérios específicos:** validar esses critérios para cada formulação, produto ou amostra que serão analisados pelo método.

Repetibilidade do sistema (por Desvio Padrão Relativo / %RSD)

Injeções em replicata para avaliar a repetibilidade do sistema.

- Se o critério de aceitação $\leq 2,0\%$ → exige-se 5 injeções
- Se o critério de aceitação $> 2,0\%$ → exige-se 6 injeções

Para avaliar da repetibilidade do sistema em métodos de determinação do **teor em monografias para compostos** em que não é especificado um limite máximo para o %RSD, ele é calculado da seguinte forma (para uma sequência de replicatas da Solução Padrão):

B(%)	n=3	n=4	n=5	n=6
2,0	0,41	0,59	0,73	0,85
2,5	0,52	0,74	0,92	1,06
3,0	0,62	0,89	1,10	1,27

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

Sendo:

\bar{X} = média das respostas obtidas

X_i = resposta individual obtida

n = número de replicatas

$$Max \%RSD = \frac{KB\sqrt{n}}{t_{90\%,n-1}}$$

K = constante (0,349)

B = $L_s - 100\%$

L_s = Limite superior da especificação

n = número de injeções da solução de referência

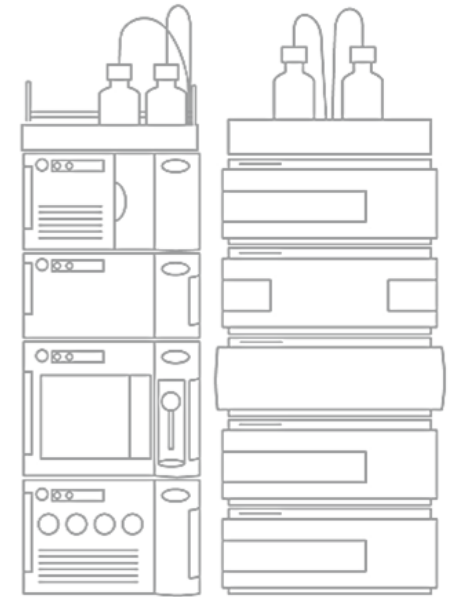
$t_{90\%, n-1}$ = valor de t tabelado, 90% de confiança e GL (graus de liberdade) = n-1

Ajustes em métodos analíticos compendiais – premissas

- ❑ A seção *System Suitability* do Capítulo Geral <621> Chromatography descreve a faixas permitidas para mudanças nos parâmetros e suas proporções dos métodos compendiais, com o objetivo de melhorar a separação cromatográfica.
- ❑ Estes ajustes não podem ser feitos para **compensar problemas** com coluna ou mau funcionamento do sistema.
- ❑ O usuário tem que **avaliar as características de performance** analítica após os ajustes.
- ❑ Ajustes são permitidos somente se há **Padrões de Referência** para todos os componentes usados no teste de verificação do sistema.
- ❑ Ajustes múltiplos podem ter **efeito de interação ou cumulativos**, e devem ser avaliados criticamente.
- ❑ Ajustes na **composição da fase móvel em eluições por gradiente** podem impactar a seletividade do método e não são recomendadas.
- ❑ **Não são permitidas** mudanças nas dimensões da coluna cromatográfica e partícula (e conseqüentemente em ajustes de vazão de fase móvel) para métodos por gradiente.
- ❑ Mudança na **característica química da fase estacionária** é considerada uma mudança relevante no método e requer validação completa.

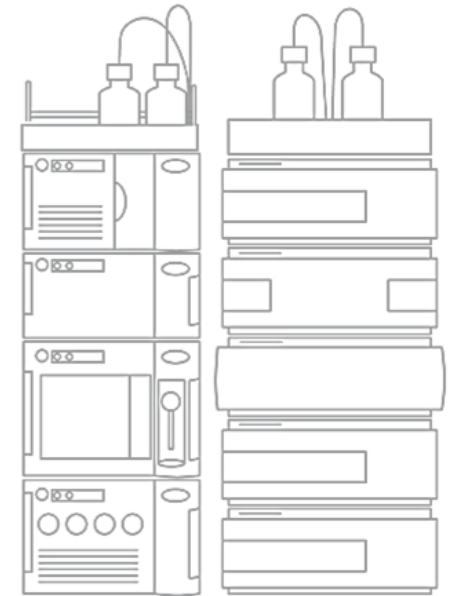
Ajustes em métodos analíticos compendiais - HPLC

- ❑ **pH da fase móvel (HPLC):** $\pm 0,2$ unidades de pH do valor especificado.
- ❑ **Concentração de sais no tampão (HPLC):** $\pm 10\%$, desde que a variação de pH esteja dentro da faixa permitida.
- ❑ **Comprimento de onda do detector UV/Vis (HPLC):** mudanças não são permitidas, erro máximo do detector deve ser ± 3 nm (procedimento do fabricante ou outro procedimento validado).
- ❑ **Vazão da fase móvel (HPLC):** pode ser ajustado em $\pm 50\%$.
- ❑ **Volume injetado (HPLC):** pode ser ajustado desde que consistente com o limite de detecção, linearidade e precisão do método.
 - ❑ Atenção aos impactos nos picos, resultantes de possível sobrecarga na coluna. Checar parâmetros de performance do método analítico.
- ❑ **Temperatura da coluna (HPLC):** $\pm 10^{\circ}\text{C}$. Uso do forno é recomendado para controle e reprodutibilidade do t_R .



Ajustes em métodos analíticos compendiais - HPLC

- ❑ **pH da fase móvel (HPLC):** $\pm 0,2$ unidades de pH do valor especificado.
- ❑ **Concentração de sais no tampão (HPLC):** $\pm 10\%$, desde que a variação de pH esteja dentro da faixa permitida.
- ❑ **Comprimento de onda do detector UV/Vis (HPLC):** mudanças não são permitidas, erro máximo do detector deve ser ± 3 nm (procedimento do fabricante ou outro procedimento validado).
- ❑ **Vazão da fase móvel (HPLC):** pode ser ajustado em $\pm 50\%$.
- ❑ **Volume injetado (HPLC):** pode ser ajustado desde que consistente com o limite de detecção, linearidade e precisão do método.
 - ❑ Atenção aos impactos nos picos, resultantes de possível sobrecarga na coluna. Checar parâmetros de performance do método analítico.
- ❑ **Temperatura da coluna (HPLC):** $\pm 10^\circ\text{C}$. Uso do forno é recomendado para controle e reprodutibilidade do t_R .



Ajustes em métodos analíticos compendiais - HPLC

Proporção dos componentes da fase móvel:

- ❑ Mudanças permitidas somente para componentes em proporção $\leq 50\%$
- ❑ Proporção pode ser ajustada em $\pm 30\%$ (relativo)
- ❑ O ajuste não pode exceder $\pm 10\%$ (absoluto)

- ❑ Fases móveis com **2 componentes**:

Exemplo 1: Acetonitrila e Metanol (50:50). 30% de 50 = 15% absoluto = excede o máximo de $\pm 10\%$ absoluto permitido. Faixa de mudança máxima permitida = 40:60 – 60:40.

Exemplo 2: Tampão e Acetonitrila (98:2). 30% de 2 é 0.6% absoluto. Assim, o ajuste máximo é na faixa de (98,6:1,4) – (97,4:2,6).

- ❑ Fases móveis com **3 componentes**:

Exemplo 3: Tampão, Acetonitrila e Metanol (60:35:5). Tampão não podemos mudar ($>50\%$). Para Acetonitrila, 30% de 35% é 10,5% absoluto, o que excede o permitido de $\pm 10\%$ absoluto; assim, podemos ajustá-lo na faixa de 25%–45% absoluto. Para o Metanol, 30% de 5% é 1,5% absoluto. Em todas as opções, ajustamos a proporção de tampão para resultar em 100%. Assim, as faixas permitidas são: 50:45:5 – 70:25:5 ou 58,5:35:6,5 – 61,5:35:3,5.



Ajustes em métodos analíticos compendiais - HPLC

- ❑ **Comprimento da coluna (HPLC):** de acordo com o tamanho de partícula;
- ❑ **Tamanho de partícula (dp) e comprimento da coluna (L) (HPLC):** podem ser modificados desde que a razão L/dp permaneça constante ou entre -25% e 50% da razão L/dp estabelecida.

Alternativamente, outras combinações de L e dp podem ser adotadas, de forma que o número de pratos teóricos (N) seja -25% e 50% da resultante pelo uso da coluna recomendada.

- ❑ **Diâmetro interno da coluna (HPLC):** pode ser ajustado se a velocidade linear for mantida constante.



Ajustes em métodos analíticos compendiais - HPLC

- Cálculo da vazão da fase móvel (HPLC) quando as dimensões da coluna tiverem sido modificadas:

$$F_2 = F_1 \times [(dc_2^2 \times dp_1)/(dc_1^2 \times dp_2)]$$

F_2 = vazão do método ajustado (mL/min)

F_1 = vazão do método original (mL/min)

dc_i = diâmetro da coluna i (mm)

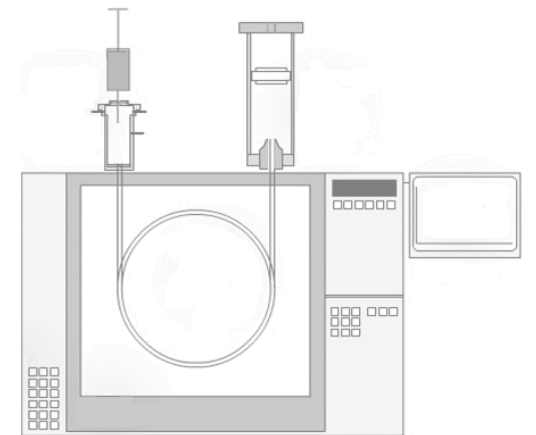
dp_i = diâmetro da partícula i (μm)

- A Eficiência da coluna cromatográfica deve ser mantida; uma queda de até 20% pode ser justificada.



Ajustes em métodos analíticos compendiais - GC

- ❑ **Comprimento da coluna cromatográfica (GC):** pode ser ajustado em $\pm 70\%$.
- ❑ **Diâmetro interno da coluna cromatográfica (GC):** pode ser ajustado em $\pm 50\%$.
- ❑ **Espessura do filme (GC):** pode ser ajustado em -50% a 100%.
- ❑ **Particle size (GC):** mudanças na partícula do suporte de um tamanho maior para menor ou de um tamanho menor para maior é aceitável se a cromatografia atender aos requisitos de system suitability e a mesma proporção de faixa de tamanho de partícula for mantida: a razão da faixa de tamanho de partícula é definida como o diâmetro da maior partícula dividido pelo diâmetro da menor partícula.
- ❑ **Flow rate (GC):** a vazão pode ser ajustada em até $\pm 50\%$ (observação: quando a monografia especifica um parâmetro de velocidade linear, o ajuste de velocidade permitido é entre +50% e -25%, desde que o sistema de gás de arraste possa ser mantido sob controle nos pontos de ajuste desejados).
- ❑ **Volume de injeção e split volume (GC):** o volume de injeção e o split volume podem ser ajustados se a detecção e a repetibilidade forem satisfatórias.
- ❑ **Temperatura do forno (GC):** a temperatura do forno pode ser ajustada em $\pm 10\%$.
- ❑ **Programa de temperatura do forno (GC):** o ajuste das temperaturas é permitido conforme indicado acima. Quando a temperatura especificada deve ser mantida ou quando a temperatura deve ser alterada de um valor para outro, é permitido um ajuste de até $\pm 20\%$.



Revisão do Capítulo Geral <621> Chromatography – pontos importantes

Version Document Tools Document

usp USP-NF Search for General Chapter, Monograph here! Hi, Rafael Bookmarks EN Help

START HERE GENERAL NOTICES GENERAL CHAPTERS MONOGRAPHS REAGENTS AND REFERENCE TABLES RESOURCES

NOT YET OFFICIAL
To be Official on 1-Dec-2022

BOOKMARK REMOVE ALERT CROSS-REF EMAIL LINK PRINT PAGE TRAINING PDF

GENERAL CHAPTERS > GENERAL TESTS & ASSAYS > .(601)TO.(999)PHYSICAL TESTS & DETERMINATIONS > (621) **REFERENCE STANDARDS**

CHROMATOGRAPHY

SHOW SEARCH KEYWORDS

<621> CHROMATOGRAPHY

Change to read:

INTRODUCTION

Chromatographic separation techniques are multistage separation procedures in which the components of a sample are distributed between two phases, one of which is stationary while the other is mobile. The stationary phase may be a solid or a liquid supported on a solid or a gel. The stationary phase may be packed in a column, spread as a layer, or distributed as a film, etc. The mobile phase may be gaseous or liquid or supercritical fluid. The separation may be based on adsorption, mass distribution (partition), ion exchange, etc. or

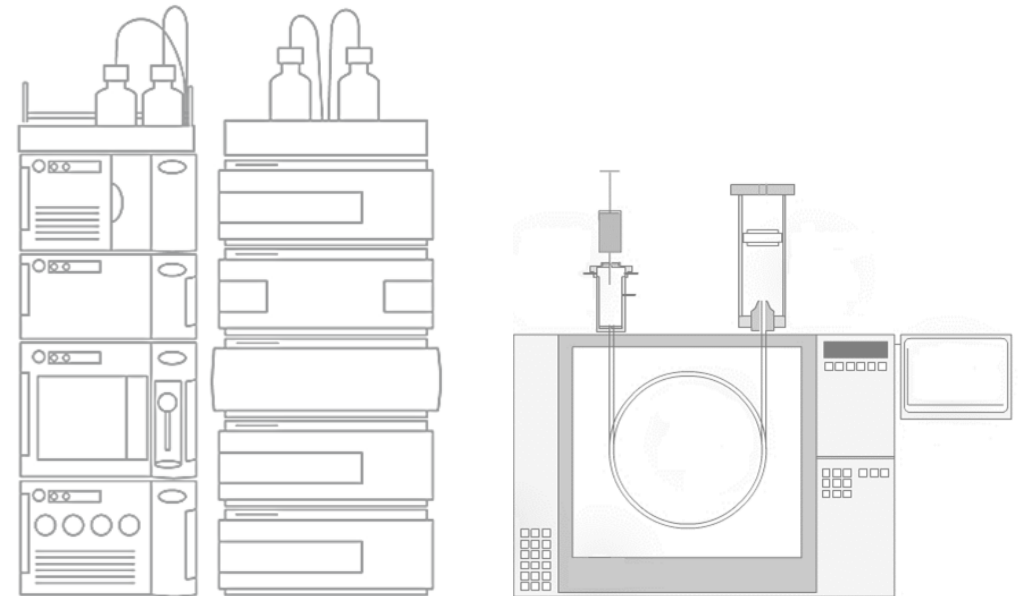
Revision Toggle

Revision Jumper

Principais mudanças

Seções:

- Liquid Chromatography: Isocratic Elution
- Liquid Chromatography: Gradient Elution
- Gas Chromatography

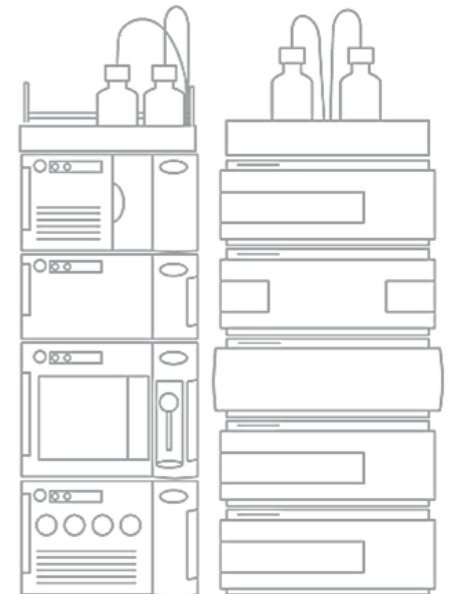


Principais mudanças - HPLC

Liquid Chromatography - Isocratic elution

- **Adjustments from totally porous to superficially porous particles:** For the application of particle-size adjustment from totally porous to superficially porous particles, other combinations of L and dp can be used, provided that the plate number (N) is within -25% to +50%, relative to the prescribed column. These changes are acceptable, provided that system suitability criteria are fulfilled, and selectivity and elution order of the specified impurities to be controlled are demonstrated to be equivalent.
- **Internal diameter:** In absence of a change in particle size and/or length, the internal diameter of the column may be adjusted. Caution is necessary when the adjustment results in smaller peak volumes due to a smaller particle size or smaller internal column diameter, a situation that may require adjustments to minimize extra-column band broadening by factors such as instrument connections, detector cell volume and sampling rate, and injection volume. The flow rate is adjusted for both the change in column diameter and particle size:

$$F_2 = F_1 \times [(dc_2^2 \times dp_1)/(dc_1^2 \times dp_2)]$$



Principais mudanças - HPLC

Liquid Chromatography - Isocratic elution

- ❑ **Injection volume:** Even in the absence of any column dimension change, the injection volume may be varied provided system suitability criteria remain within their established acceptability limits. When the injection volume is decreased, special attention is given to (limit of) detection and repeatability of the peak response(s) to be determined. An increase is permitted provided, in particular, linearity and resolution of the peak(s) to be determined remain satisfactory.

When the column dimensions are changed, the following equation may be used for adjusting the injection volume:

$$V_{inj2} = V_{inj1} \times \frac{(L_2 \times d_{c2}^2)}{(L_1 \times d_{c1}^2)}$$

Where:

V_{inj1} = injection volume indicated in the monograph (μL)

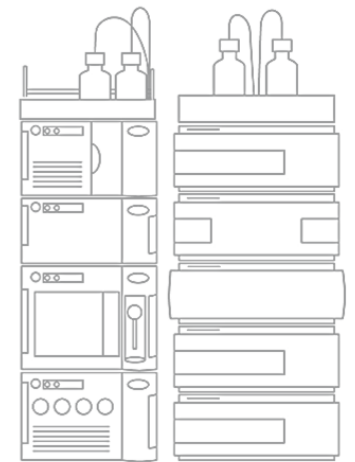
V_{inj2} = adjusted injection volume (μL)

L_1 = column length indicated in the monograph (mm)

L_2 = length of the column used (mm)

d_{c1} = internal diameter of column indicated in the monograph (mm)

d_{c2} = internal diameter of the column used (mm)



Principais mudanças - HPLC

Liquid Chromatography - Gradient elution

- **Column parameters and flow rate:** a change in column dimensions, and thus in column volume, impacts the gradient volume which controls selectivity. Gradients are adjusted to the column volume by changing the gradient volume in proportion to the column volume. This applies to every gradient segment volume. Since the gradient volume is the gradient time, t_G , multiplied by the flow rate, F , the gradient time for each gradient segment needs to be adjusted to maintain a constant ratio of the gradient volume to the column volume (expressed as $L \times d_{c2}^2$). Thus, the new gradient time, t_{G2} can be calculated from the original gradient time, t_{G1} , the flow rate(s), and the column dimensions as follows:

$$t_{g2} = t_{g1} \times \frac{F_1}{F_2} \times \frac{(L_2 \times d_{c2}^2)}{(L_1 \times d_{c1}^2)}$$

Where:

t_{g1} = original gradient time (min)

t_{g2} = new gradient time (min)

F_1 = original flow rate (mL/min)

F_2 = new flow rate (mL/min)

L_1 = column length indicated in the monograph (mm)

L_2 = column length of the column used (mm)

d_{c1} = column diameter indicated in the monograph (μm)

d_{c2} = column diameter of the column used (μm)



Principais mudanças - HPLC

Liquid Chromatography - Gradient elution

- ❑ *Column temperature (HPLC):* $\pm 5^{\circ}$ C, where the operating temperature is specified, unless otherwise prescribed.



Principais mudanças - HPLC

Liquid Chromatography - Gradient elution

Column parameters and flow rate

(...)Thus, the change in conditions for gradient elution requires three steps:

1. Adjust the column length and particle size according to L/dp.

- **Column dimensions (particle size, length):** The particle size and/or length of the column may be modified provided that the ratio of the column length (L) to the particle size (dp) remains constant or in the range between -25% to +50% of the prescribed L/dp ratio.
- **Internal diameter:** In absence of a change in particle size and/or length, the internal diameter of the column may be adjusted. Caution is necessary when the adjustment results in smaller peak volume resulting from smaller particle size or smaller internal column diameter, a situation which may require adjustments to minimize extra-column band broadening by factors such as instrument connections, detector cell volume and sampling rate, and injection volume.

2. Adjust the flow rate for changes in particle size and column diameter. $F_2 = F_1 \times [(dc_2^2 \times dp_1)/(dc_1^2 \times dp_2)]$

3. Adjust the gradient time of each segment for changes in column length, diameter, and flow rate. $t_{g2} = t_{g1} \times \frac{F_1}{F_2} \times \frac{(L_2 \times d_{c2}^2)}{(L_1 \times d_{c1}^2)}$

Principais mudanças - HPLC

Liquid Chromatography - Gradient elution

- **Dwell volume (D) (also referred to as V_D):** The dwell volume (also known as gradient delay volume) is the volume between the point at which the eluents meet and the inlet of the column. It can be determined using the following procedure.

Column: Replace the chromatographic column by an appropriate capillary tubing (e.g., 1 m × 0.12 mm).

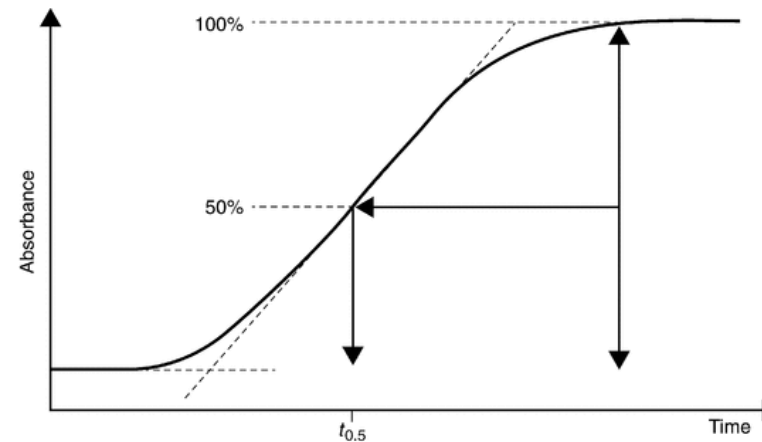
Mobile phase A: Water

Mobile phase B: 0.1% v/v solution of acetone in water

Flow rate: set to obtain sufficient back-pressure (ex: 2 mL/min)

Detection: spectrophotometer at 265 nm

Time (min)	Mobile phase A (% v/v)	Mobile phase B (% v/v)
0-20	100→0	0→100
20-30	0	100



$$t_D = t_{0.5} - 0.5t_G$$

$$D = t_D \times F$$

Where:

t_G = pre-defined gradient time (20 min)

D = dwell volume (mL)

F = flow rate (mL/min)

Where applicable, this measurement is performed with the autosampler in the "inject" position so as to include the injection loop volume in the dwell volume.

Principais mudanças - HPLC

Gradient elution

- ❑ **Dwell volume:** It is the user's responsibility to adapt the length of the isocratic step to the analytical equipment used. If the dwell volume used during the elaboration of the monograph is given in the monograph, the time points (t min) stated in the gradient table may be replaced by adapted time points (t_c , min), calculated using the following equation:

$$t_c = t - \frac{(D - D_0)}{F}$$

Where:

t = original time points

t_c = adapted time points

D = dwell volume (mL)

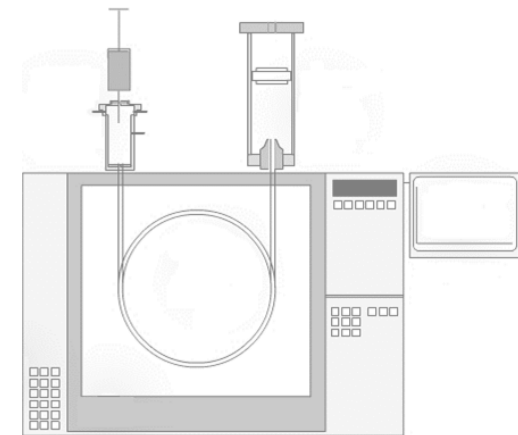
D_0 = dwell volume used for development of the method (mL)

F = flow rate (mL/min)



Principais mudanças - GC

- ❑ **Stationary phase particle size:** Maximum reduction of 50%; no increase permitted (packed columns)
- ❑ **Film thickness:** -50% to +100% (capillary columns)
- ❑ **Column length:** -70% to +100%
- ❑ **Column internal diameter:** $\pm 50\%$
- ❑ **Column temperature:** $\pm 10\%$
- ❑ **Temperature program:** adjustment of temperatures is permitted as stated above; adjustment of ramp rates and hold times of up to $\pm 20\%$ is permitted.
- ❑ **Flow rate:** $\pm 50\%$
- ❑ The above changes are acceptable provided system suitability criteria are fulfilled and selectivity and elution order of the specified impurities to be controlled are demonstrated to be equivalent.
- ❑ **Injection volume and split ratio:** may be varied provided system suitability criteria remain within their established acceptability limits. When the injection volume is decreased, or the split ratio is increased special attention is given to (limit of) detection and repeatability of the peak response(s) to be determined. An increase in injection volume or decrease in split ratio is permitted provided, in particular, linearity and resolution of the peak(s) to be determined remain satisfactory.
- ❑ **Injection port temperature and transfer-line temperature in static headspace conditions:** $\pm 10^\circ \text{C}$, provided no decomposition or condensation occurs.



Discussion



Empowering a healthy tomorrow

USP Education