

Validação de Métodos Analíticos

Especificidade / Seletividade

Margareth R. C. Marques, M.Sc., Ph.D.

Sr. Principal Scientist



ICH Q2(R1), USP e ANVISA :

- ▶ The ability to assess unequivocally the analyte in the presence of components which may be expected to be present, such as impurities, degradation products, and matrix components
- ▶ Lack of specificity of an individual analytical procedure may be compensated by other supporting analytical procedure(s)

Especificidade versus Seletividade



- ▶ IUPAC, AOAC, ANVISA, etc., preferem utilizar o termo “seletividade”, reservando “especificidade” para aqueles procedimentos que são completamente seletivos.

▶ Objetivos:

- Identificação: assegurar a identificação da substância em análise.
- Testes de pureza: declaração precisa do teor de impurezas da substância em análise (compostos relacionados, metais pesados, solventes residuais, etc.)
- Teor: resultado exato que permite declaração precisa do teor ou potência da substância em análise presente na amostra.

- ▶ Alguns procedimentos analíticos não são suficientemente específicos para a finalidade a que se destinam
 - Teor por titulação
 - Teor de enantiômero por método aquiral
 - Identificação por absorbância no UV
- ▶ Combinação de dois ou mais procedimentos analíticos é recomendada para se conseguir a especificidade apropriada.



- ▶ Especificidade é particularmente importante para métodos que são “indicadores de estabilidade”

- ▶ “Validated quantitative analytical procedure that can detect the changes with time in the pertinent properties of the drug substance and drug product. It accurately measures the active ingredients, without interference from degradation products, process impurities, excipients, or other potential impurities.”

FDA Guidance for Industry - Analytical Procedures and Methods Validation, 2000

- ▶ Deve ser um dos primeiros itens a ser validado.
- ▶ Quando os critérios de aceitação não são atendidos, isto é um indicativo de que o método não foi desenvolvido de maneira apropriada.
- ▶ Baixa especificidade pode ter impacto na exatidão, precisão, e linearidade.

- ▶ Investigação da especificidade deve ser conduzida durante a validação de:
 - Teste de identificação
 - Determinação de impurezas
 - Teor
 - Testes de desempenho

- ▶ Assegurar a identidade da substância em análise.
- ▶ Discriminação entre compostos de estrutura similar que possam estar presentes na amostra.

- ▶ Resultados positivos - comparação com referência, utilizando amostras que contenham a substância em análise
 - Método analítico estabelecido
 - Padrão de referência caracterizado
- ▶ Resultados negativos - amostras que não contêm a substância em análise

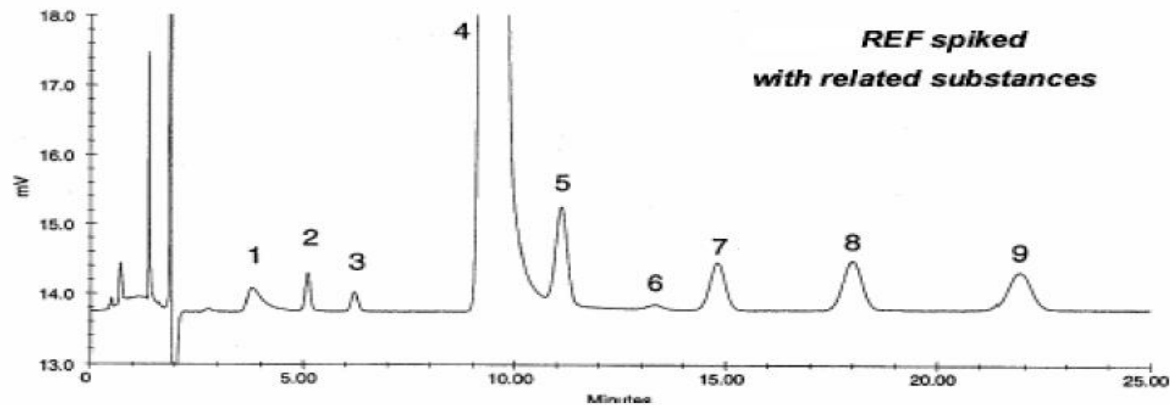
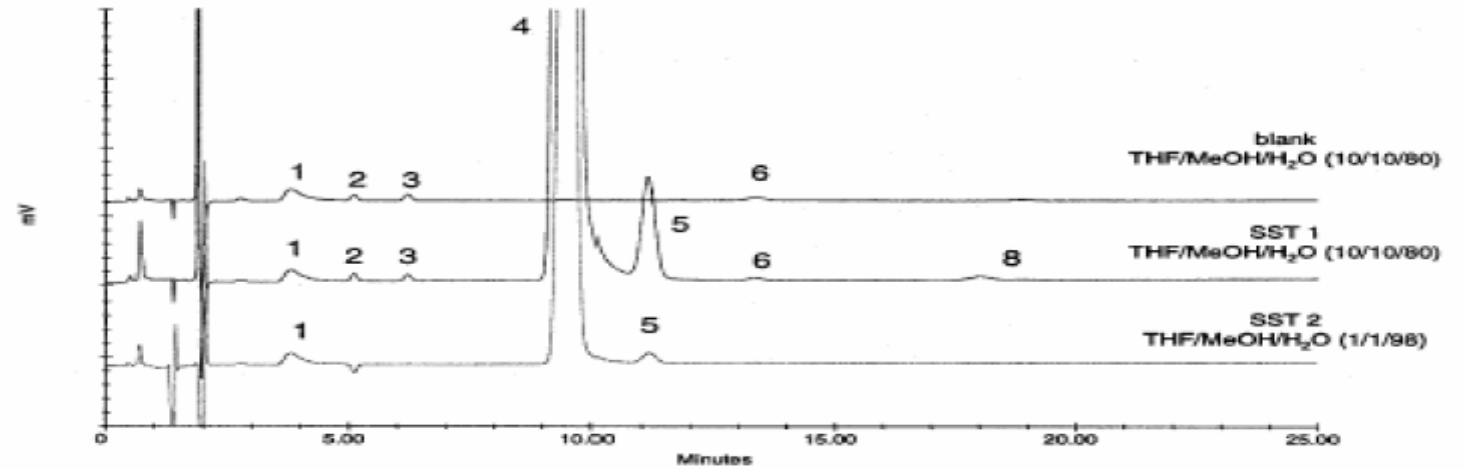
- ▶ Pode ser aplicado a materiais com estrutura similar ou próxima à da substância em análise para confirmar que uma resposta positiva não é obtida.
- ▶ A escolha dos materiais que poderão interferir deve ser feita considerando-se os interferentes que poderão estar presentes.

- ▶ Cromatogramas representativos devem ser utilizados para demonstrar especificidade. Cada componente individual deve ser identificado de maneira apropriada
- ▶ Separações críticas - podem ser demonstradas pela resolução de dois componentes que eluem próximos um do outro - Verificação do sistema.

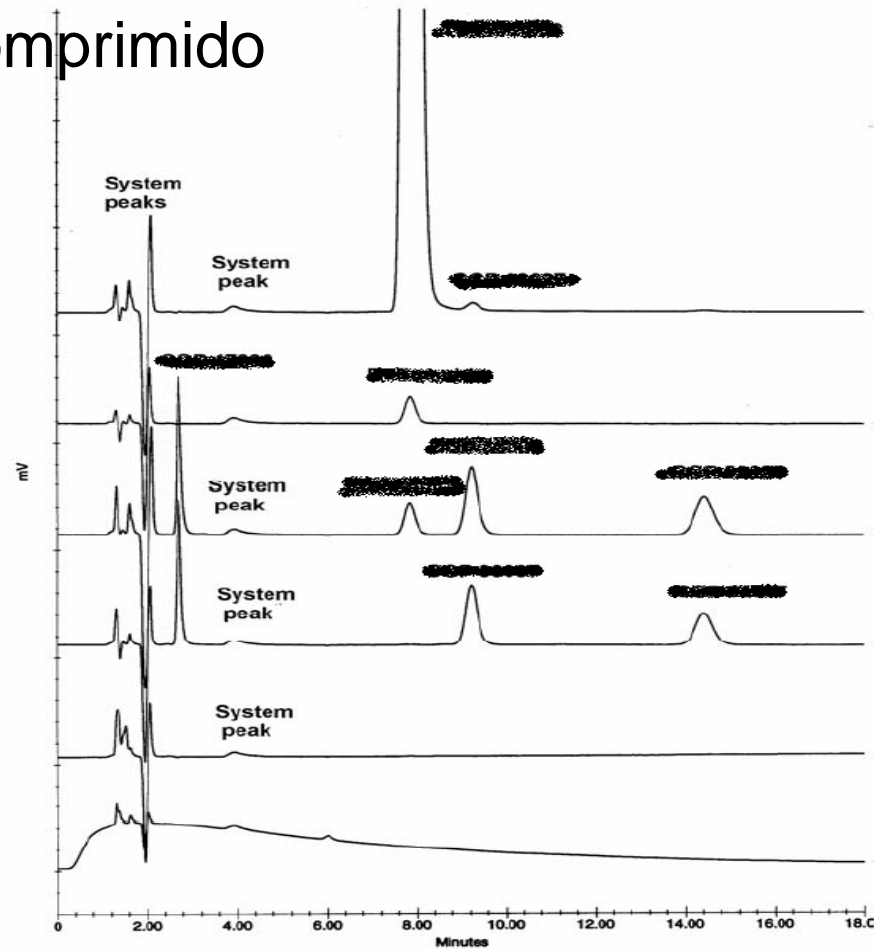
Teor e Testes para Impurezas



▶ Exemplo



▶ Exemplo - Comprimido



1. Stressed sample

2. [Redacted]

3. [Redacted] + [Redacted] +
[Redacted] + [Redacted] +
Placebo

4. Placebo + [Redacted] +
[Redacted] + [Redacted]

5. Placebo

6. Mobile Phase

- ▶ Método para teor não específico deve ser associado com outros procedimentos analíticos (titulação e um teste apropriado para impurezas)
 - Diloxanide Furoate
 - Teor por titulação, compostos relacionados por CCD.
 - Flurazepam Hydrochloride
 - Teor por titulação, compostos relacionados por HPLC

Teor e Testes para Impurezas



Duas situações para verificar especificidade:

- ▶ Impurezas disponíveis
- ▶ Impurezas não disponíveis

▶ Impurezas disponíveis

- Conhecimento das impurezas geradas durante o processo de síntese e degradação a partir de dados históricos
- Coleção de impurezas e produtos de degradação é desenvolvida e caracterizada
- Quantidades suficientes estão disponíveis.

▶ Impurezas disponíveis

– Teste para Impurezas

- Contaminar o fármaco ou a forma farmacêutica com quantidades apropriadas de impurezas
- Demonstrar separação individual dessas impurezas e separação dos outros componentes presentes na matriz da amostra.

▶ Impurezas disponíveis

- Teor - discriminação da substância em análise na presença de impurezas e/ou excipientes
 - Contaminar (fármaco ou forma farmacêutica) com quantidades apropriadas de impurezas e/ou excipientes
 - Comparar com amostras não contaminadas
 - Teor não é afetado pela presença desses materiais: resultado exato que permita declaração precisa do teor ou potência da substância em análise presente na amostra.

▶ Impurezas não disponíveis

- Comparação dos resultados obtidos com amostras contendo impurezas ou produtos de degradação com outro método bem caracterizado (método farmacopéico, método independente validado).
- Amostras armazenadas em condições de estresse: luz, calor, umidade, hidrólise ácido/base, e oxidação.

▶ Impurezas não disponíveis

- Método para impurezas - os perfis de impurezas dos dois métodos devem ser comparados.
- Teor - os resultados dos dois métodos devem ser comparados.

- ▶ Ausencia de interferencia de produtos de degradacao
- ▶ Condicoes de degradacao: ampla faixa de pH, oxidacao, calor, luz
- ▶ **Isencao:**
 - Produtos que atendem notificacao, identificacao e qualificacao de produtos de degradacao em medicamentos
 - Metodos de desempenho
 - Metodos nao cromatograficos

- ▶ Podem ser realizadas tanto na forma sólida como com soluções.
- ▶ Condições mais severas que as utilizadas nos estudos de estabilidade acelerada.
- ▶ Um lote do material
- ▶ Degradação térmica, hidrolítica, oxidativa, e fotolítica do fármaco e da forma farmacêutica.

- ▶ *Guideline for submitting samples and analytical data for methods validation, FDA, 1987.*
 - **Fármacos:**
 - calor (50°C)
 - luz
 - ácido (HCl 0,1 N) / base (NaOH 0,1 N)
 - oxidante (H₂O₂ 3%)

▶ Formas Farmacêuticas

- calor
- luz
- umidade (85%)

▶ Em alguns casos, outras condições podem ser aplicadas.

- Tempo de exposição, temperatura, e concentração podem ser ajustados para se obter grau de degradação apropriado da amostra.

▶ Impurezas não disponíveis

- Os picos da substância em análise são avaliados quanto à pureza de pico utilizando amostras suficientemente estressadas para se obter 10 - 15% de degradação.

- ▶ Reynolds, D. W., Facchine, K. L., Mullaney, J. F., Alsante, K. M., Hatajik, T. D., Motto, M. G. – Available guidance and best practices for conducting forced degradation studies. *Pharm. Technol.*, fevereiro 2002.
- ▶ Bakshi, M., Singh, S. – ICH Guidance in practice – Stress degradation studies on metronidazole and development of a validated stability-indicating HPLC assay method. *Pharm. Technol.*, outubro 2003.
- ▶ Farmer, S., Anderson, P., Burns, P., Velagaleti, R. – Forced degradation of ibuprofen in bulk drug and tablets and determination of specificity, selectivity, and the stability-indicating nature of the USP ibuprofen assay method. *Pharm. Technol.*, maio 2002.
- ▶ Klick, S. et. Al. – Toward a generic approach for stress testing of drug substances and drug products. *Pharm. Technol.*, fevereiro de 2005.

www.pharmtech.com

▶ Teste de pureza de pico

- Mostrar que o pico cromatográfico da substância em análise não é atribuído a mais de um componente.
- Análises subsequentes utilizando outras técnicas: diode array, espectrometria de massa, sistema cromatográfico diferente, etc.
- Programa para avaliação estatística - cálculo do fator de semelhança.

Exemplo 2



- ▶ Método por HPLC para teor e compostos relacionados para o fármaco ABC
 - coluna C18, 5 μm , 4,6 mm x 25 cm
 - Diluente tampão hexano-1-ácido sulfônico sódio 0,01 M, pH 3.5
 - Fase móvel tampão/acetonitrila/metanol (900:94:6)
 - Comprimento de onda 265 nm

Exemplo 2



- ▶ Comparação dos seguintes cromatogramas:
 - diluente
 - solução de verificação do sistema
 - solução padrão contendo o fármaco ABC
 - solução da amostra exposta a condições de estresse
 - teste de pureza de pico e análise espectral do pico principal

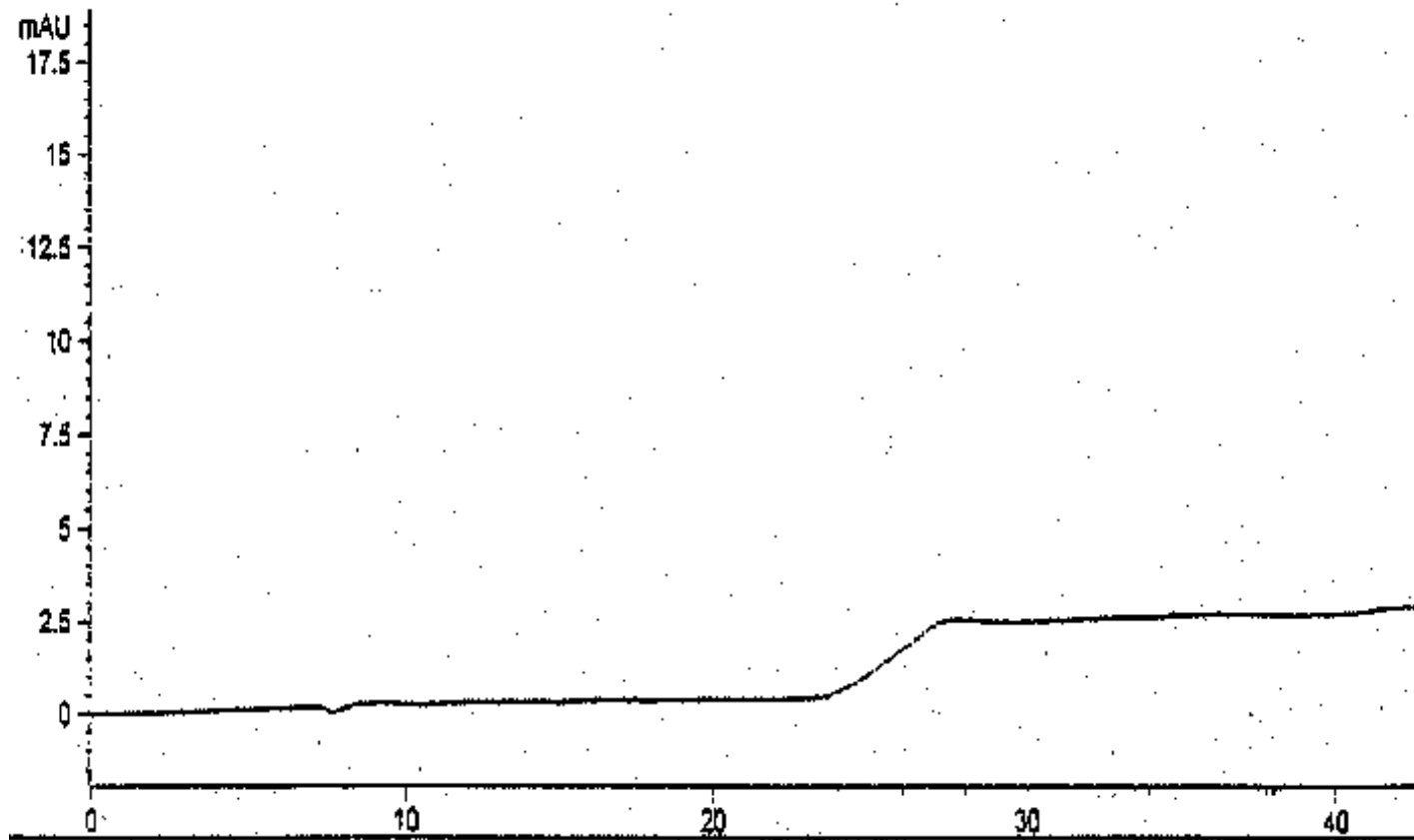
▶ Critério

- Diluente não deve apresentar nenhum pico detectável nos tempos de retenção das impurezas
- Impurezas conhecidas devem estar separadas entre si e do pico principal (Resolução $\geq 1,5$)
- Produtos de degradação devem estar separados do pico principal (Resolução $\geq 1,5$)
- Pureza de pico do pico principal no teste de estresse (fator de similaridade ≥ 980)

Exemplo 2

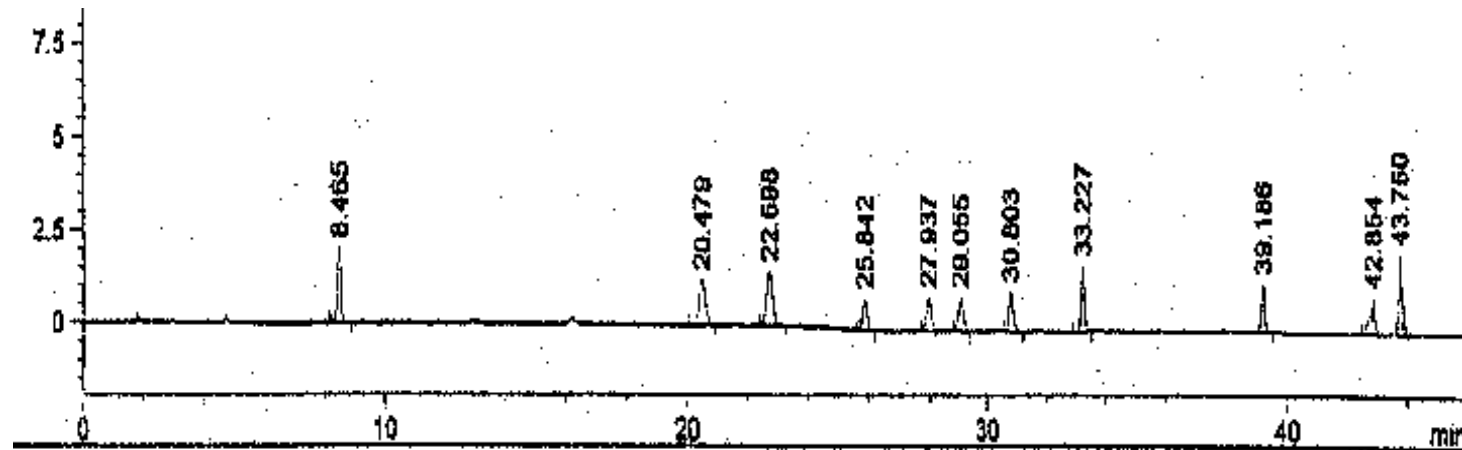


Cromatograma do diluente - ausência de picos nos tempos de retenção do componente principal e impurezas



Exemplo 2

Cromatograma da Solução padrão - impurezas conhecidas devem estar separadas umas das outras e do pico principal ($R \geq 1,5$)

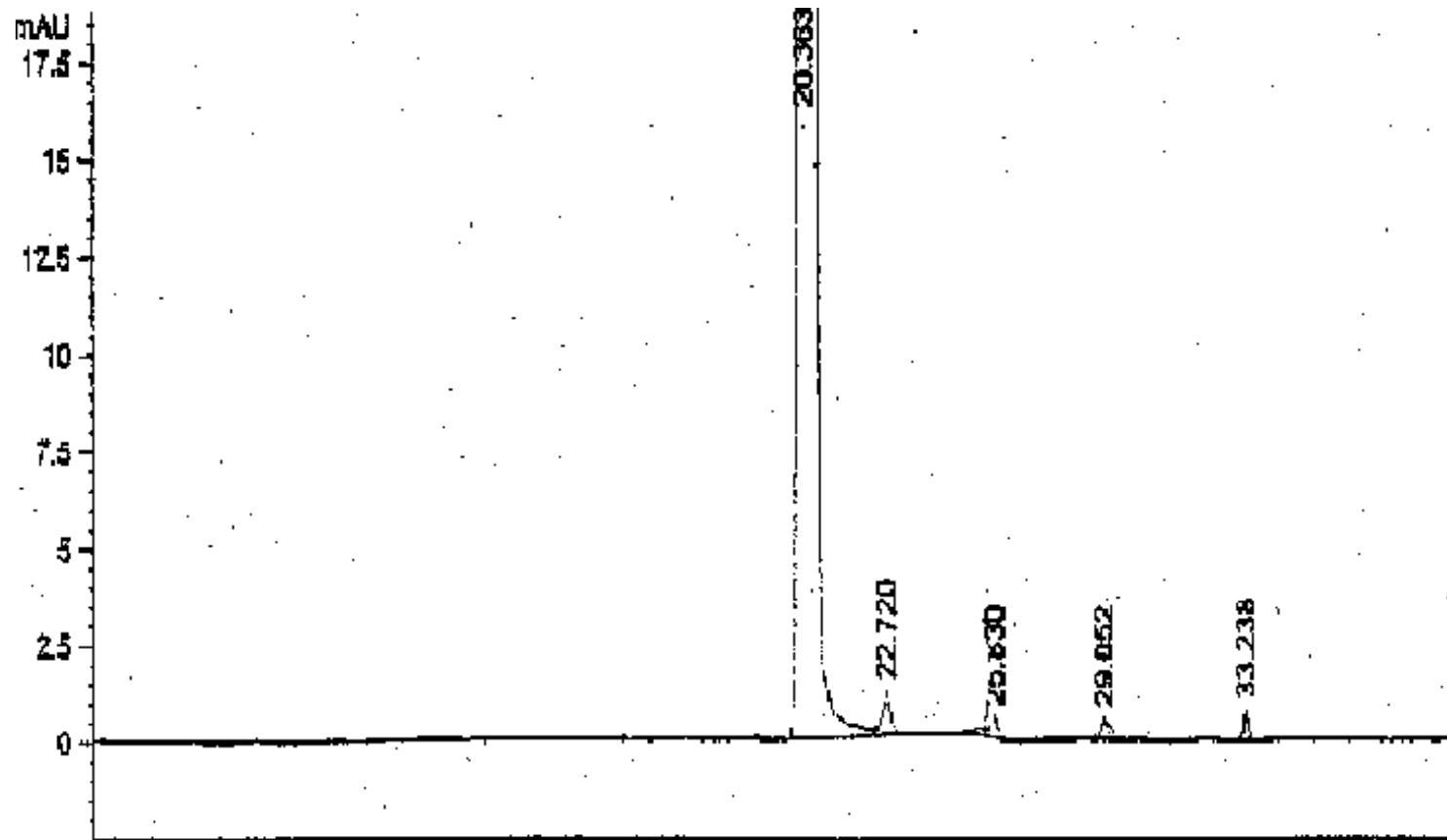


▶ Condições de estresse

- solução em HCl 0,05 M (8 horas)
- solução em NaOH 0,02 M (8 horas)
- solução em H₂O₂ 0,15% (1,5 horas)
- aquecimento da solução da amostra a 100°C (9 horas)
- aquecimento da amostra sólida a 120°C (17 horas)
- exposição luz UV (14 dias)

Exemplo 2

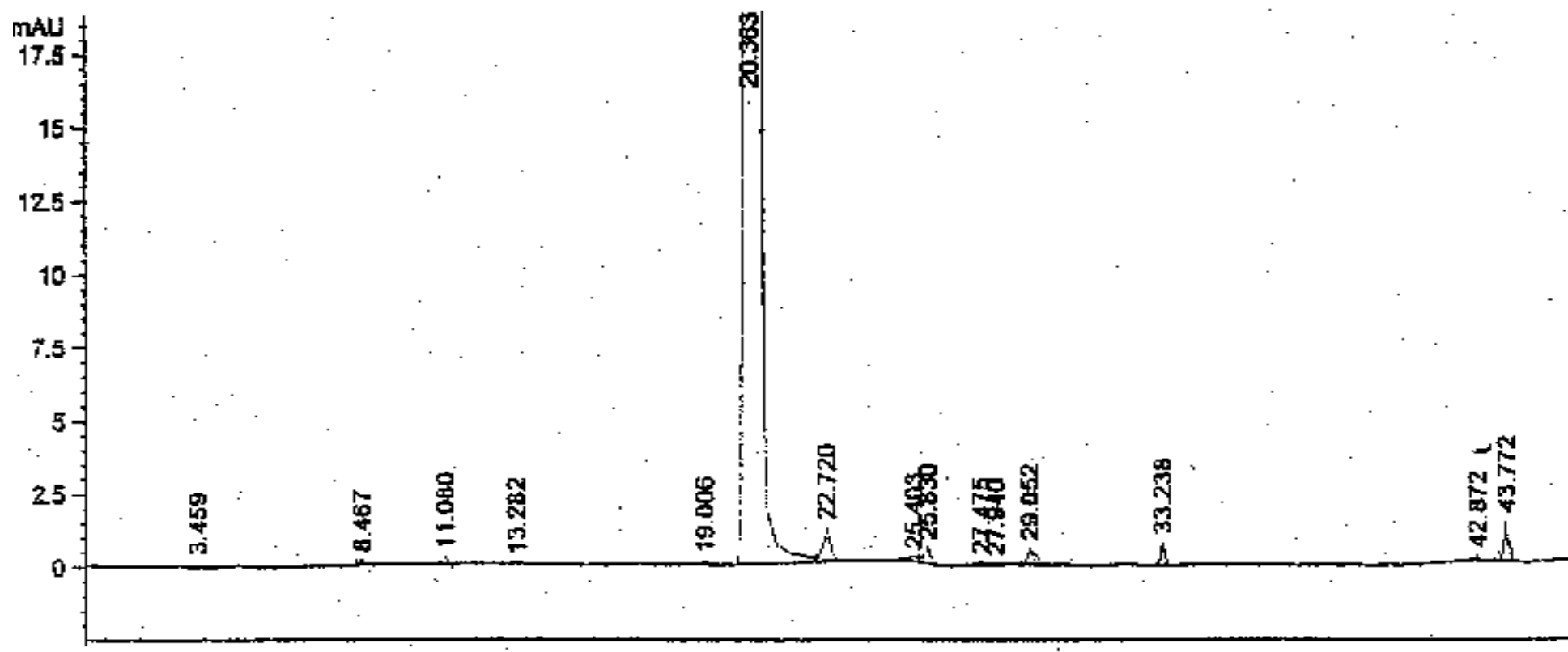
Cromatograma da amostra não estressada



Exemplo 2



Cromatograma da amostra estressada - produtos de degradação estão separados do pico principal, $R \geq 1,5$



Exemplo 2



Pureza de pico - fator de semelhança ≥ 980

Time	Number indicating peak purity
Dissolved in 0.05 M HCl	
0 h	999.97
4 h	999.99
8 h	999.98
Dissolved in 0.02 M NaOH	
0 h	999.98
4 h	999.99
8 h	999.99
Dissolved in 0.15 % H ₂ O ₂ solution	
0 h	999.97
1.5 h	999.99
100 °C in solution	
4 h	999.98
9 h	999.98
120 °C, solid sample	
3 h	999.98
5 h	999.98
9 h	999.96
17h	999.99
UV light	
14 days	999.95

- ▶ Avaliação da substância em análise na presença de outros componentes (impurezas, produtos de degradação, excipientes)
- ▶ Pureza de pico (homogeneidade espectral)
- ▶ Se não for específico o suficiente, combinar vários procedimentos analíticos

Discussion



Empowering a healthy tomorrow

USP Education

Thank You



Empowering a healthy tomorrow

USP Education

Stay Connected

(301) 230-6304 | <http://education.usp.org> | Education@usp.org



Empowering a healthy tomorrow

USP Education