

Validação de Métodos Analíticos

Linearidade / Faixa de Trabalho

Margareth R. C. Marques

Principal scientific liaison



- ▶ Linearidade de um método analítico - capacidade de obter uma resposta (um resultado analítico) que é diretamente proporcional a concentração da substância em análise.

- ▶ Uma relação linear requer menor número de padrões para definir a curva resposta que uma relação não linear
- ▶ Justifica o uso de padrão único para determinações quantitativas dentro da faixa de linearidade

▶ LINEARIDADE

- Avaliada dentro de uma faixa
- Exame visual do gráfico resposta versus concentração
- Avaliação estatística do coeficiente de correlação, intersecção com o eixo y, coeficiente angular, e soma residual dos quadrados da regressão linear ou após transformação matemática

▶ LINEARIDADE

- Realizada diretamente com o fármaco (diluição da solução estoque do padrão)
- Pesagens individuais dos componentes da forma farmacêutica
- Recomendação: mínimo 5 concentrações

▶ LINEARIDADE

- mínimo 5 concentrações diferentes em triplicata
- Avaliada dentro de um intervalo especificado
- Diluicoes a partir de solucao-mae

- ▶ Exigida em -
 - Teor Testes para impurezas
- ▶ Pode ser necessário para
 - Testes de Performance
 - Não necessário para
 - Ensaio Limite
 - Identificação

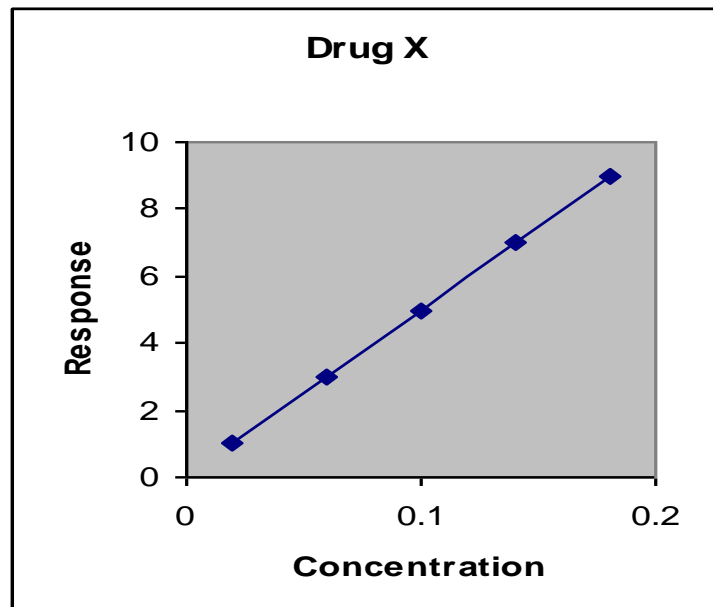
A resposta é proporcional à concentração?

- ▶ Uso de, no mínimo, 5 pontos para avaliação apropriada.
- ▶ Observação visual do gráfico e método estatístico (regressão linear, quadrados mínimos)
- ▶ Interseccao com o eixo Y

- ▶ Transformação matemática antes da análise por regressão linear (semilog) (depende da técnica analítica)
- ▶ Alguns procedimentos, p.ex. ensaios biológicos, não demonstram linearidade mesmos após transformação. Uso de vários padrões.

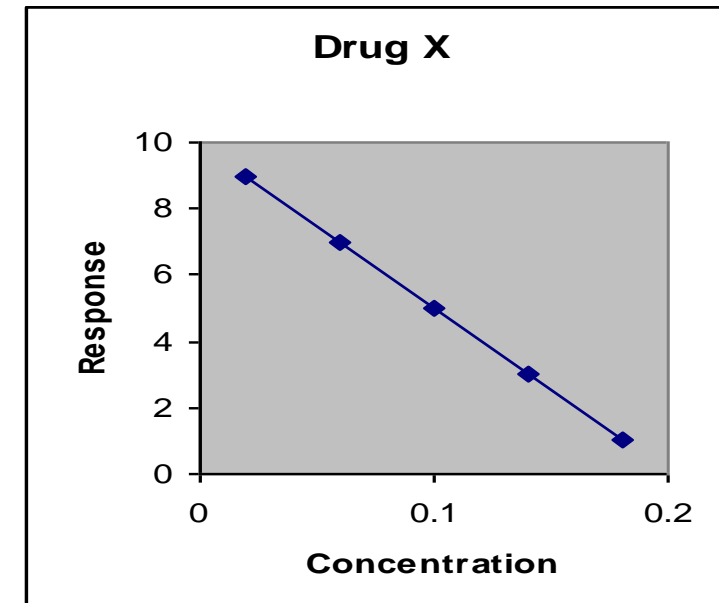
- ▶ Dados obtidos a partir da regressão linear são utilizados para estimar o grau de linearidade
 - Coeficiente de Correlação (r) ou (r^2)
ANVISA – mínimo 0,990
 - Intersecção com o eixo Y
 - Coeficiente angular
 - dados vs. reta de melhor ajuste

- ▶ Coeficiente de correlação (r) = avaliação estatística entre duas propriedades
- ▶ r^2 é geralmente utilizado para avaliar o grau de ajuste



$$r = 0.9999$$

$$r^2 = 0.9998$$

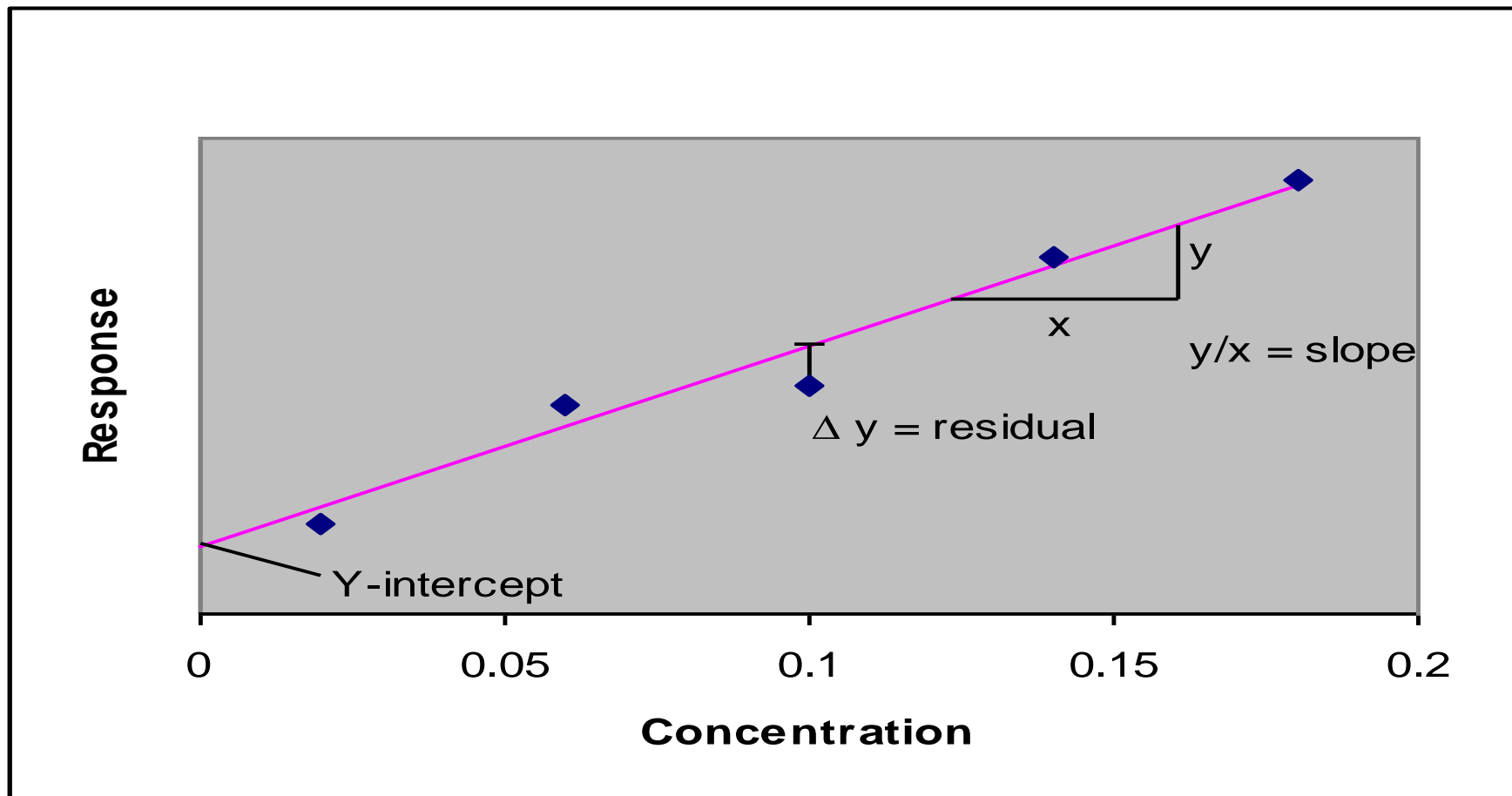


$$r = -0.9999$$

$$r^2 = 0.9998$$

- ▶ Coeficiente de correlação (r) ou (r^2)- critério mínimo:
 - ≥ 0.990 até ≥ 0.9999
 - Geralmente utilizado mas tem limitações - pode ser distorcido nos pontos longe da média, se os pontos não forem igualmente espaçados

- ▶ Intersecção com o eixo Y, coeficiente angular, e resíduos



▶ Intersecção com o eixo Y

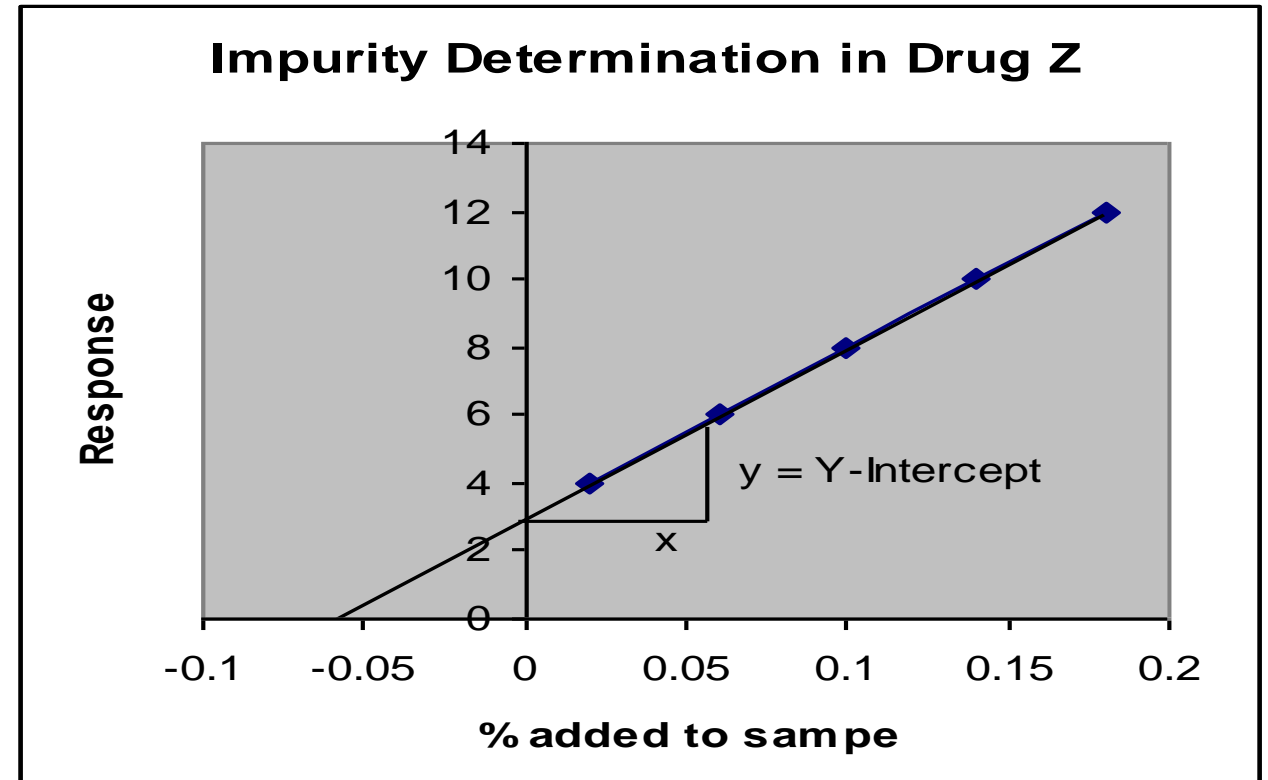
- Exigência comum - não deve ser estatisticamente diferente de 0 (intervalo de confiança, 2σ a 95%, deve incluir 0)

- ▶ Intersecção com o eixo Y - não deve ser maior que $n\%$ da resposta padrão
 - “n” depende do tipo de método
 - ~2% para teor
 - ~10-20% para impurezas

Dados de Linearidade



- ▶ Outros usos de intersecção com o eixo Y
- ▶ Quantificação utilizando curva de calibração por adição de padrão à amostra



Determinação da intersecção com o eixo X para determinar a quantidade presente na amostra.

- ▶ Coeficiente angular da reta de regressão - sensibilidade da resposta
 - Cromatografia - relação entre os coeficientes angulares para fatores de resposta de impurezas ou para mostrar que o fator de resposta não é necessário, se dentro do intervalo $\pm 10\%$
 - Eletroquímica - útil em titulações por oxiredução (n° de e^-)

- ▶ Amostras não devem ser analisadas utilizando método de padrão único a não ser que linearidade/exatidão adequadas tenham sido estabelecidas.



Faixa de linearidade

- ▶ The interval between the upper and lower levels of analyte (including these levels) that have been demonstrated to be determined with a suitable level of precision, accuracy, and linearity.

- ▶ Teor: 80% a 120%
- ▶ Uniformidade de Conteúdo: 70% a 130%
- ▶ Dissolução: -20% menor concentração esperada a +20% maior concentração esperada a partir do perfil de dissolução
- ▶ Impurezas: LQ até 120% no limite da especificação para cada impureza individual
- ▶ Teor e Impurezas: LQ até 120% da concentração da substância ativa

▶ Faixa de linearidade

- Se os testes para Teor e Impurezas forem combinados e somente um padrão, a 100%, é utilizado, a linearidade deve incluir desde o limite da impureza até 120% da especificação para Teor (0,05% - 120%)

- ▶ Desenvolvimento de métodos combinados – a faixa de linearidade deve cobrir de 50 a 150% da especificação do teste para Teor
- ▶ Algumas referências indicam que uma faixa de linearidade mais ampla deveria ser utilizada (20-200%).

- ▶ Deve haver um balanço entre rigor científico e limitações práticas
- ▶ Não deve ser muito ampla para não causar a rejeição de um método que é apropriado para o uso ao qual se destina.

Um método para Teor necessário para a faixa de 80-120% pode não ter exatidão e precisão adequadas para uma faixa de 50-150%.

- ▶ Critério de aceitação deve contrabalançar rigor científico com necessidades práticas
- ▶ Linearidade -
 - Valor mínimo $r^2 \geq 0.990$ até ≥ 0.9999
 - Intersecção com o eixo Y - estatisticamente insignificante, na faixa de n% da resposta solução padrão
 - Adequado para Teor com padrão único
- ▶ Faixa de linearidade - necessária para resultados exatos e precisos

Revisão dos resultados

- ▶ Os resultados são apropriados para a validação da linearidade?
 - O critério de aceitação estabelecido no protocolo foi atendido?
- ▶ Os resultados de linearidade têm impacto sobre exatidão?
 - Padrão único ou múltiplo?
- ▶ Mudanças devem ser propostas considerando-se os desvios de linearidade?

Determinação do teor do fármaco X a granel e em comprimidos

Objetivo - método único para determinar Teor e Uniformidade de distribuição da dose no granel e em comprimidos

Amostra - Fármaco X 0.025 mg/mL em diluente

Padrão - 0.025 mg/mL (100%) fármaco X como padrão único no diluente

Sistema cromatográfico -

Coluna - C8, 4 x 125 mm

Fase móvel - 5% ACN, 95% 0,05M fosfato, pH 6

Exemplo 1 - Critérios de aceitação



Correlação $r^2 \geq 0.999$

Intersecção com

o eixo Y

estatisticamente insignificante

menor que $\pm 2\%$ resposta do padrão

Linearidade/

exatidão

padrão único dentro de $\pm 2\%$

da faixa de 50-150%

Linearidade - Exemplo 1



% Level	mg/mL Conc.	Peak area (10 ⁵)
150	0.0381	16.1557
120	0.0305	12.8856
110	0.0279	11.8992
100	0.0254	10.8444
90	0.0228	9.7376
80	0.0203	8.6422
50	0.0127	5.3779

Slope = 423 (x 10⁵)
Y-int = 0.049 (x 10⁵)
(s.d. 0.051)
Corr., r² = 0.9998

Exemplo 1- Revisão dos resultados

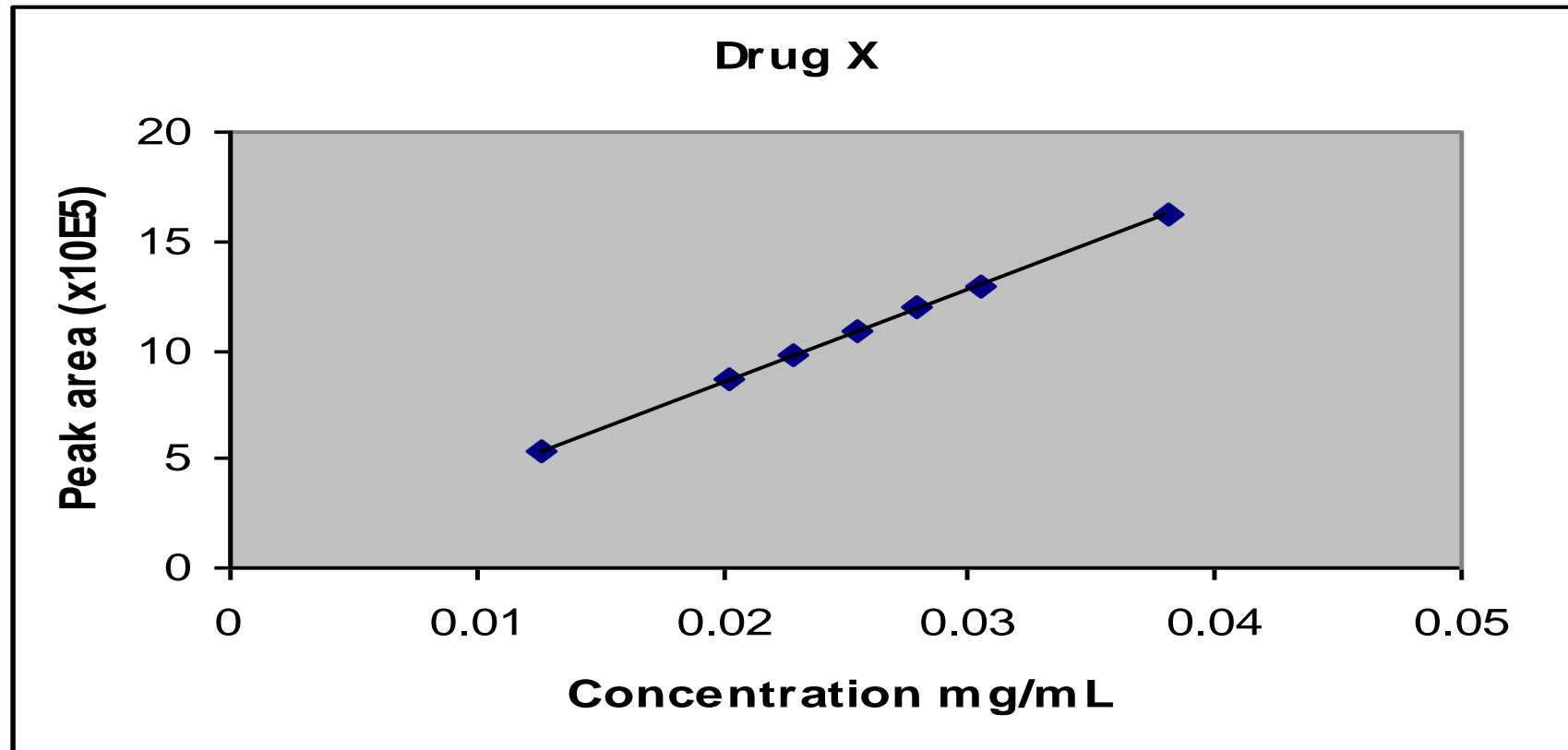


- ▶ Os resultados de linearidade são adequados para a validação?
 - Os critérios de aceitação foram atendidos?

Linearidade - Exemplo 1



- ▶ Avaliação visual -
- ▶ Correlação, $r^2 - 0.9998 \geq 0.999$



- ▶ Inters. Y significativa com 95% de confiança?

Não, se inters. $Y < (2 \times \text{desvio padrão})$

$$(2 \times 0,051) = 0,102 (2\sigma)$$

$0,049 < 0,102$, Não significativa

- ▶ Inters. Y menos que 2% da resposta padrão?

Sim, se inters. $Y < \text{Resp. padrão} \times 0,02$

$$10,84 \times 0,02 = 0,217 (2\% \text{ do padrão})$$

$0,049 < 0,217$, Aceitável

Linearidade - Exemplo 1



% Level	mg/mL Conc.	Peak area (10 ⁵)
150	0.0381	16.1557
120	0.0305	12.8856
110	0.0279	11.8992
100	0.0254	10.8444
90	0.0228	9.7376
80	0.0203	8.6422
50	0.0127	5.3779

$$\% = \text{Peak Area} / [\text{Conc.} \times \text{Std Resp. (Area/conc.)}] \times 100$$

Exemplo 1, revisão dos resultados



- ▶ Quantificação vs. padrão único está dentro da faixa $\pm 2\%$
- ▶ Faixa - Linearidade aceitável para a faixa de 50% to 150% do objetivo

Linearidade - Exemplo 2



Determinação de compostos relacionados no fármaco

Objetivo - método para determinação de impurezas individuais na faixa de 0,05% a 2%.

Diluyente - Fase móvel

Amostra - Fármaco X 1 mg/mL em diluyente

Padrão - 0,002 mg/mL (0.2%) Fármaco X padrão único em diluyente

Sistema cromatográfico -

Coluna - C8, 4 x 125 mm

Fase móvel - 5% ACN, 95% 0,05M Phosphate, pH 6

Exemplo 2- Critérios de aceitação



Correlação

$$r^2 \geq 0.999$$

Inters. Y

estatisticamente insignificante

menor que $\pm 20\%$ resposta
padrão

Linearidade/

Precisão

para padrão único $\pm 10\%$

da faixa de 0,05 - 2%

Linearidade - Exemplo 2



% Level	mcg/mL Conc.	Peak area
2.0	20.363	21797
1.0	10.182	10340
0.5	5.091	4890
0.2	2.036	1863
0.1	1.018	885
0.08	0.814	633
0.05	0.509	261

Slope = 1079

Y-int = -356 (s.d. 208)

Corr., $r^2 = 0.9994$

Exemplo 2 - Revisão dos resultados

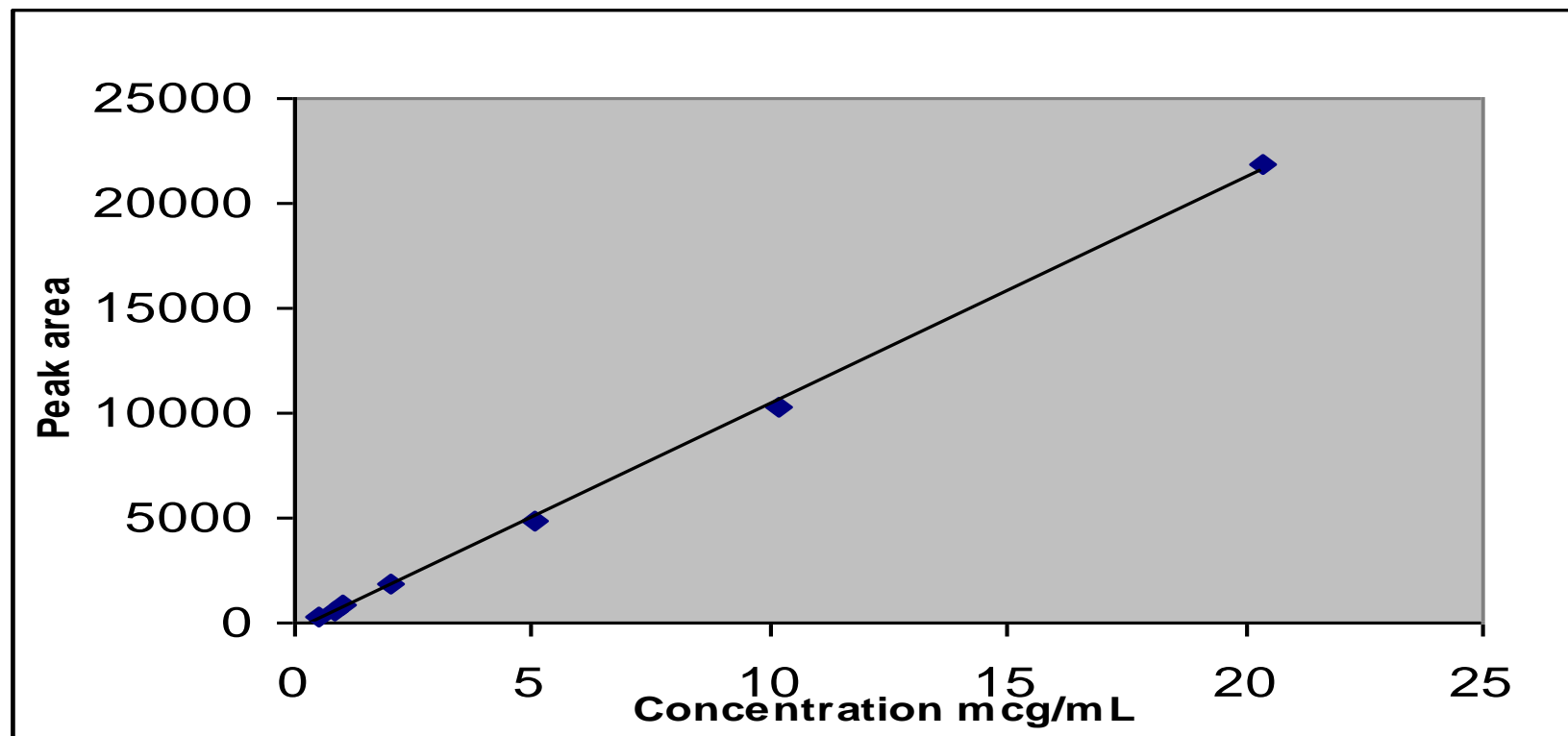


- ▶ Os dados de linearidade são apropriados para a validação?
 - Os critérios de aceitação foram atendidos?

Linearidade - Exemplo 2



- ▶ Avaliação visual -
- ▶ Correlação, r^2 0,9994 \geq 0,999



Exemplo 2- Revisão dos resultados



- ▶ Inters. Y significativa com 95% de confiança?
Não, se inters. $Y < (2 \times dp)$
 $(2 \times 208) = 416 (2\sigma)$
 $356 < 416$, Não significativa
- ▶ Inters. Y menor que 20% da resposta padrão?
Sim, se inters. $Y < (Resp. padrão \times 0.2)$
 $1863 \times 0.2 = 373$ (20% do padrão)
 $356 < 373$, Aceitável

Linearidade - Exemplo 2



% Level	mcg/mL Conc.	Peak area	% vs Standard
2.0	20.363	21797	117
1.0	10.182	10340	111
0.5	5.091	4890	105
0.2	2.036	1863	100
0.1	1.018	885	95
0.08	0.814	633	85
0.05	0.509	261	56

Linearidade de impurezas no fármaco X - linearidade/exatidão da quantificação vs padrão único

$$\% = \text{Peak Area} / [\text{Conc.} \times \text{Std Resp. (Area/conc.)}] \times 100$$

- ▶ Quantificação vs. padrão único não está na faixa de $\pm 10\%$
- ▶ Faixa - LQ (0,05%) to 2% (2 x especificação) não está validada quando fase móvel é utilizada como diluente

Linearidade - Exemplo 2



% Level	mcg/mL Conc.	Peak area
2.0	20.167	23991
1.0	10.084	12348
0.5	5.042	5876
0.2	2.017	2422
0.1	1.008	1199
0.08	0.807	921
0.05	0.504	561

Slope = 1196

Y-int = -9.8 (s.d. 159)

Linearidade - Exemplo 2



% Level	mcg/mL Conc.	Peak area	% vs Standard
2.0	20.167	23991	99
1.0	10.084	12348	102
0.5	5.042	5876	97
0.2	2.017	2422	100
0.1	1.008	1199	99
0.08	0.807	921	95
0.05	0.504	561	93

- ▶ Padrão estava se distribuindo no diluente durante diluições seriais
- ▶ Mudança para um diluente mais forte (20% ACN) foi necessária
 - Quantificação vs. padrão único está dentro da faixa de $\pm 10\%$
 - Linearidade - LQ (0,05%) to 2% (2 x especificação) agora está validado.

- ▶ Determinação de água <921>, método Ia para o fármaco Y (formas cristalina anidra e hidratada)
- ▶ Objetivo- Método único para determinar água combinada total - estrutura cristalina e água de superfície para ambas as formas
- ▶ Amostra - 500 mg Fármaco Y pó, teor de água <0,1 - 5,0% (< 0,5 - 25 mg)

- ▶ Amostra insolúvel em metanol mas solúvel na mistura metanol e dimetilformamida (DMF), (1:1)
- ▶ Título do KF determinado utilizando 50 mg de água. DMF terá algum impacto na detecção potenciométrica do ponto final na determinação de baixos teores de água?

Exemplo 3 - Critérios de aceitação



Correlação	$r^2 \geq 0,99$
Inters. Y	estatisticamente insignificante
Linearidade/exatidão	dentro do intervalo $\pm 20\%$ na faixa de 0,1 - 5%
Faixa	0,5 - 25 mg água (0,1 - 5,0% de 500 mg de amostra)

Linearidade - Exemplo 3



Linearidade dos resultados de teor de água em metanol/DMF (1:1)

% Level	mg water added	mg water titrated	% response
5	25.12	25.60	102
2	10.35	10.17	98
1	5.06	5.12	101
0.6	3.03	2.91	96
0.2	1.09	1.00	92
0.1	0.51	0.43	84

Slope = 1.022

Y-int = -0.152

(s.d. 0.148)

Corr. $r^2 = 0.9998$

Sodium Tartrate dihydrate
used for low level water addition

Exemplo 3 - Revisão dos resultados



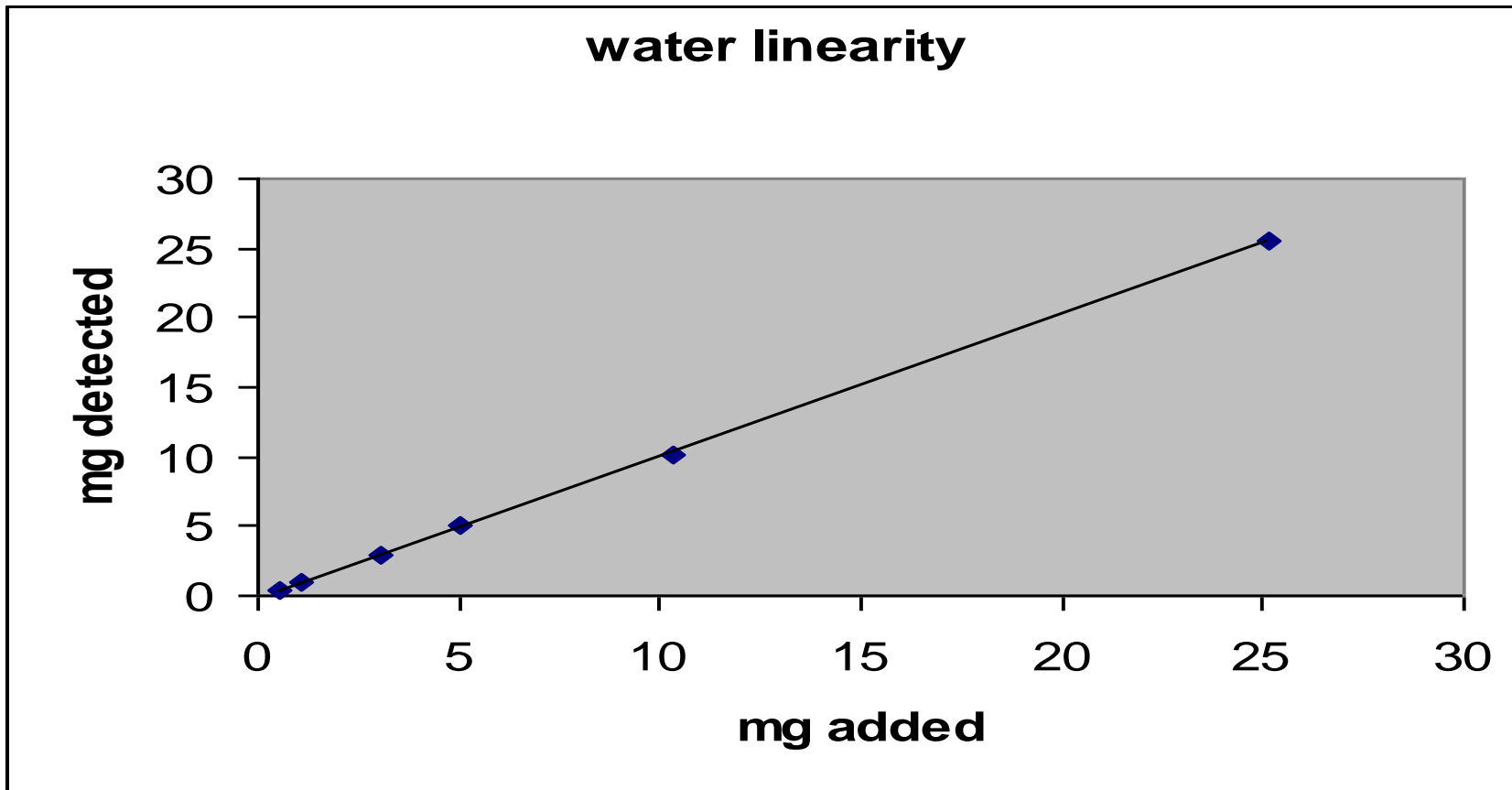
- ▶ Os resultados de linearidade são adequados para a validação?
 - Os critérios de aceitação foram atendidos?

Linearidade - Exemplo 3



Fármaco Y- linearidade dos resultados de água

Corr. r^2 - $0.9998 \geq 0.99$



- ▶ Inters. Y Significante com 95% de confiança?
Não, se inters. $Y < (2 \times dp)$
 $(2 \times 0,148) = 0.296 (2\sigma)$
 $0,152 < 0,296,$
Não significante
- ▶ Exatidão 84-102% está entre $\pm 20\%$
- ▶ Faixa LQ (0,1%) to 5%
- ▶ Critérios de validação foram atendidos.

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