

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

Margareth Marques, M.Sc., Ph.D.  
Sr. Principal Scientist



# Exatidão



- ▶ USP e ANVISA – Proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro.
- ▶ ICH- “The closeness of the test result obtained by the method to a value that is accepted as conventionally true value or as a reference value.”

- ▶ Exigida para
  - Teor (Categoria I)
  - Testes para Impurezas (Quantitativo, Categoria II)
- ▶ Pode ser exigida para
  - Testes de Performance (Categoria III, Dissolução)
- ▶ Não exigida para
  - Ensaio Limite
  - Testes de identificação

- ▶ Calculada como porcentagem da substância em análise recuperada, ou pela diferença entre o valor obtido e o valor verdadeiro avaliado estatisticamente.

- ▶ Deve ser estabelecida na faixa de quantificação especificada no método.
- ▶ ICH e ANVISA recomendam um mínimo de 9 determinações utilizando no mínimo 3 concentrações dentro da faixa de quantificação estabelecida (3 testes em 3 conc.)

- ▶ 5 modos para determinar Exatidão
  - Uso de padrão de referência
  - Mistura com excipientes (placebo contaminado)
  - Adição de padrão (amostra contaminada)
  - Determinada a partir dos dados de linearidade e especificidade
  - Comparação com um método exato (método referência)

- ▶ **Princípio Ativo**
  - Teste utilizando padrão de referência
- ▶ **Forma Farmacêutica**
  - Mistura com excipientes
  - Adição de padrão à amostra
- ▶ **Impurezas**
  - Adição de padrão
  - Determinada a partir da linearidade
- ▶ **Todos os tipos**
  - Comparação com método referência



## ▶ Princípio Ativo

- Aplicar o método em amostras com pureza conhecida (Padrão de Referência)
- Comparar os resultados obtidos com a amostra com aqueles obtidos com método referência

# Exemplo 1



## Recuperação do padrão de referência do fármaco F em diferentes níveis

Level of Method (%)	Amount added (mg)	Amount found (mg)	Recovery (%)	Statistical analysis
50	25.16	25.06	99.6	mean 99.9 RSD 0.3
50	25.31	25.34	100.1	
50	25.12	25.15	100.1	
75	37.83	37.15	98.2	
100	50.03	50.16	100.3	mean 100.0 RSD 0.3
100	50.17	49.87	99.4	
100	50.37	50.47	100.2	
100	50.35	50.35	100.0	
100	50.43	50.38	99.9	
100	50.75	50.85	100.2	
125	62.63	62.94	100.5	
150	75.13	74.43	99.1	mean 99.4 RSD 0.3
150	75.24	75.01	99.7	
150	75.12	74.67	99.4	

## Exemplo 2



### Comparação com método referência

Sample	Test Method	Reference Method	Difference
1	91.5	90.3	1.2
2	90.5	90.5	0.0
3	95.2	94.2	1.0
4	90.8	91.6	-0.8
5	96.1	95.7	0.4
		Avg.	0.36
		s.d.	0.80

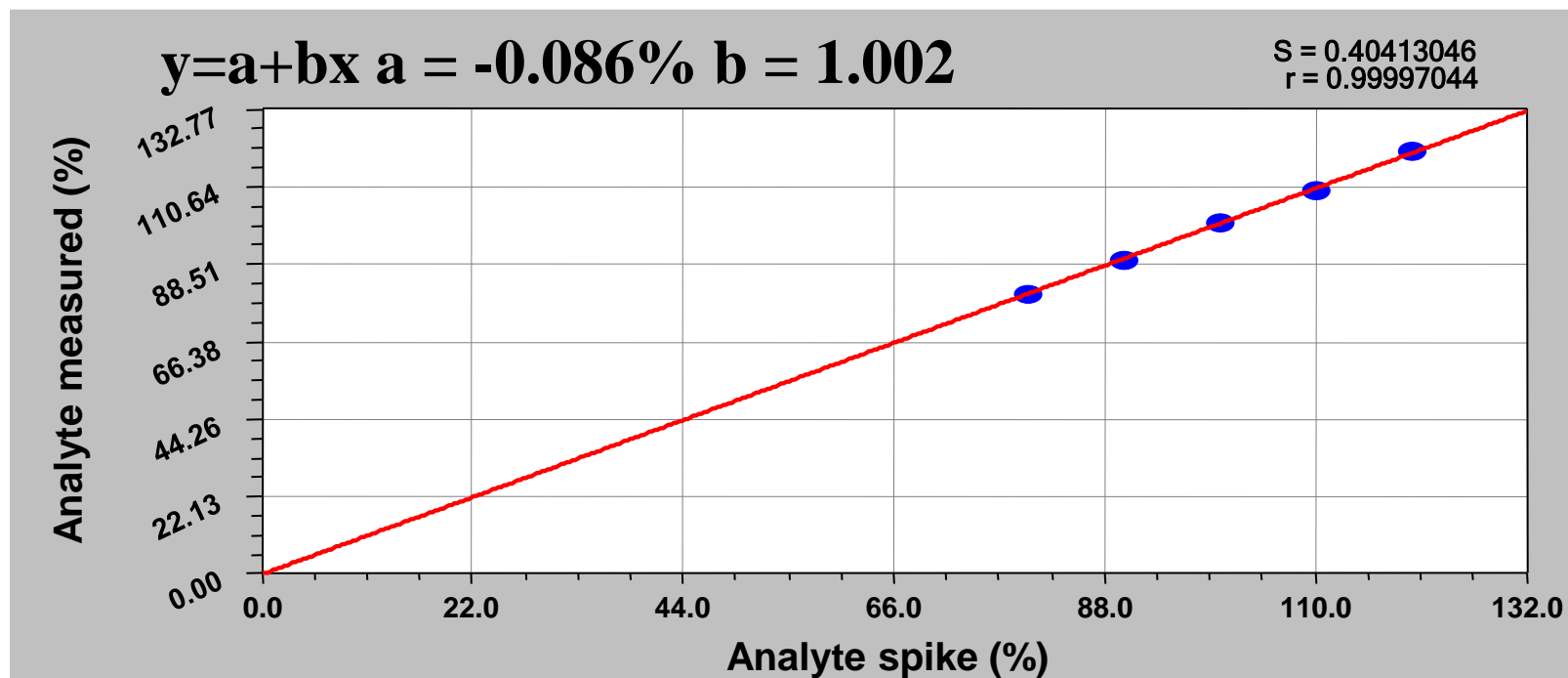
Teste T para diferenças Não há diferença com 95% de confiança

- ▶ Comparação com um método referência
  - *USP* <1010> Analytical Data – Interpretation and Treatment



- ▶ Forma Farmacêutica
  - Placebo contaminado
  - Amostra contaminada com padrão de referência
  - Comparação com um método exato

- ▶ Mistura sintética de quantidades conhecidas da amostra com excipientes (placebo)



Critério geral - coef. Ang.  $1 \pm 0,01$ , coef. corr.  $>0,995$ , e inters.  $y$   $0 \pm 1,0\%$  da concentração

## Exemplo 3



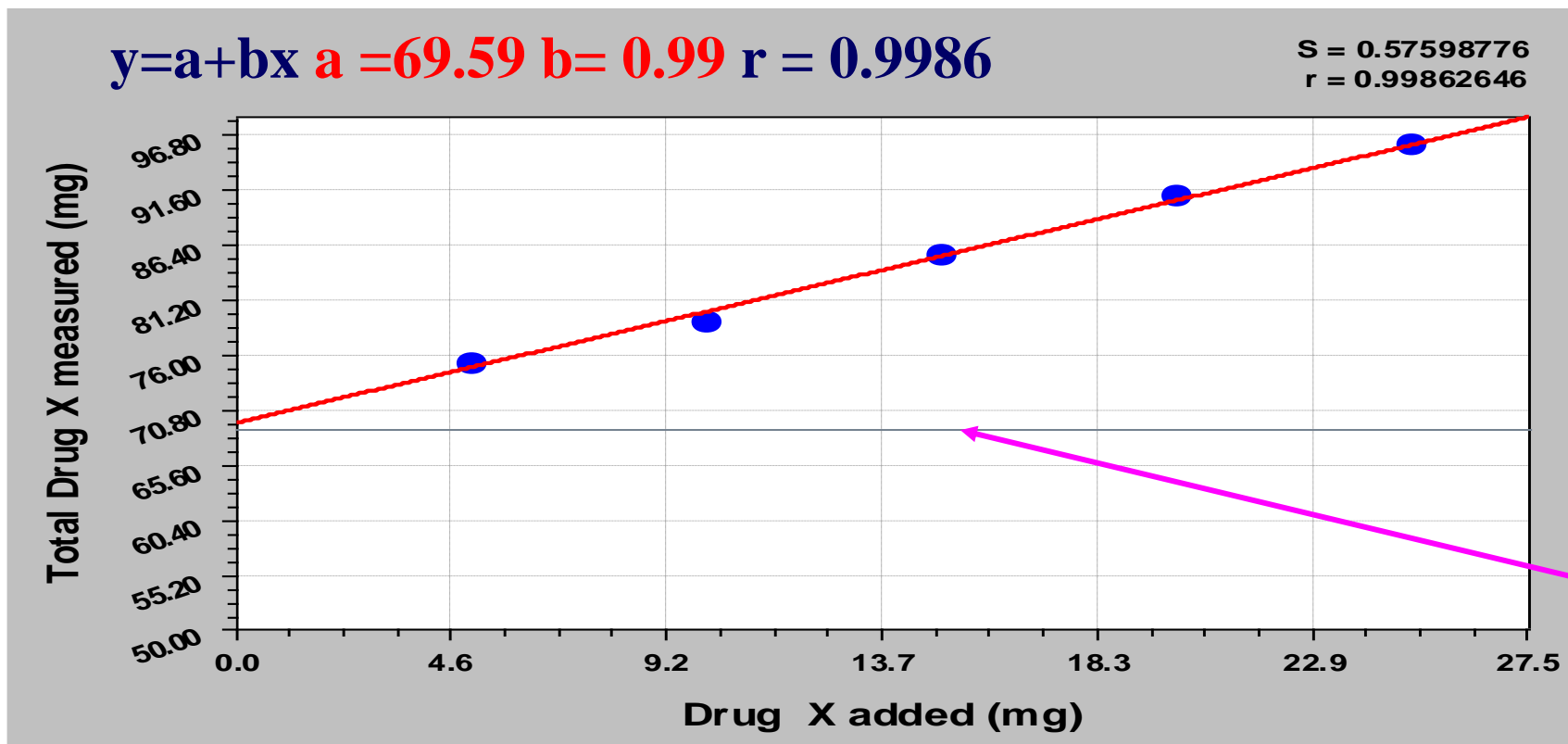
### Recuperação do fármaco X do placebo

Level (%)	Amount added (mg)	Amount found (mg)	Individual recovery (%)	Recovery by level (%)
80	38.7	39.2	101.3	99.7
	40	39.7	99.2	
	40.8	40.3	98.8	
100	50.3	50.1	99.6	99.4
	50.9	50.7	99.6	
	49.2	48.6	98.9	
120	62.5	62.3	99.7	99.6
	60.8	61.0	100.4	
	60.1	59.4	98.8	

# Exatidão - Forma farmacêutica



## Amostras contaminadas com o padrão



Initial  
analyte  
level  
(**69.8 mg**)

Critério geral - curva com coef. ang.  $>0,95$  e intercepto próximo à concentração inicial



## ▶ Impurezas (Categoria II)

### – Impurezas disponíveis

- contaminar amostra com impurezas

### – Impurezas disponíveis

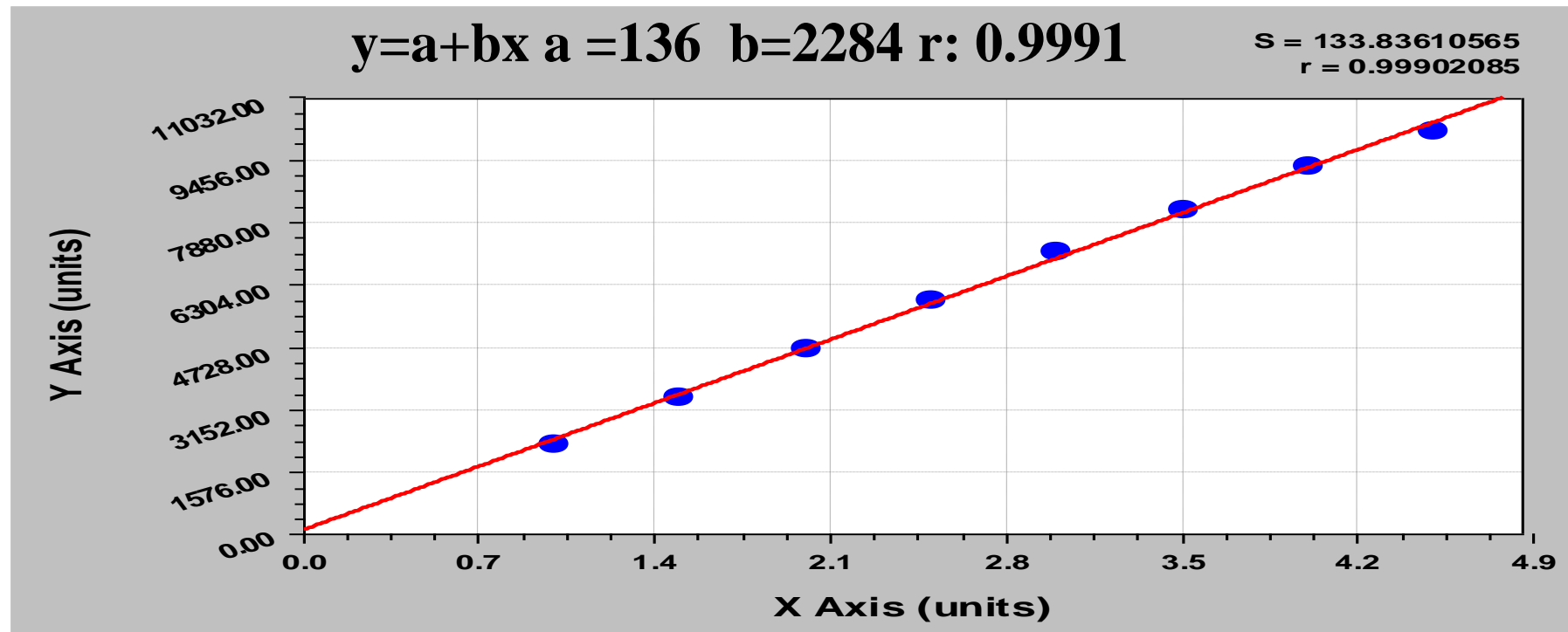
- Comparação com método referência
- Uso da recuperação do fármaco
- Fator de resposta da impureza deve ser considerado, se conhecido

- ▶ O impacto da linearidade na exatidão deve ser avaliado
  - Dados individuais de linearidade da amostra comparados com padrão
  - Útil quando uma ligeira curvatura é observada no gráfico de linearidade
  - Padrão pode ser observado até mesmo quando o coeficiente de correlação é  $>0.999$

# Estimativa da Exatidão - Impurezas



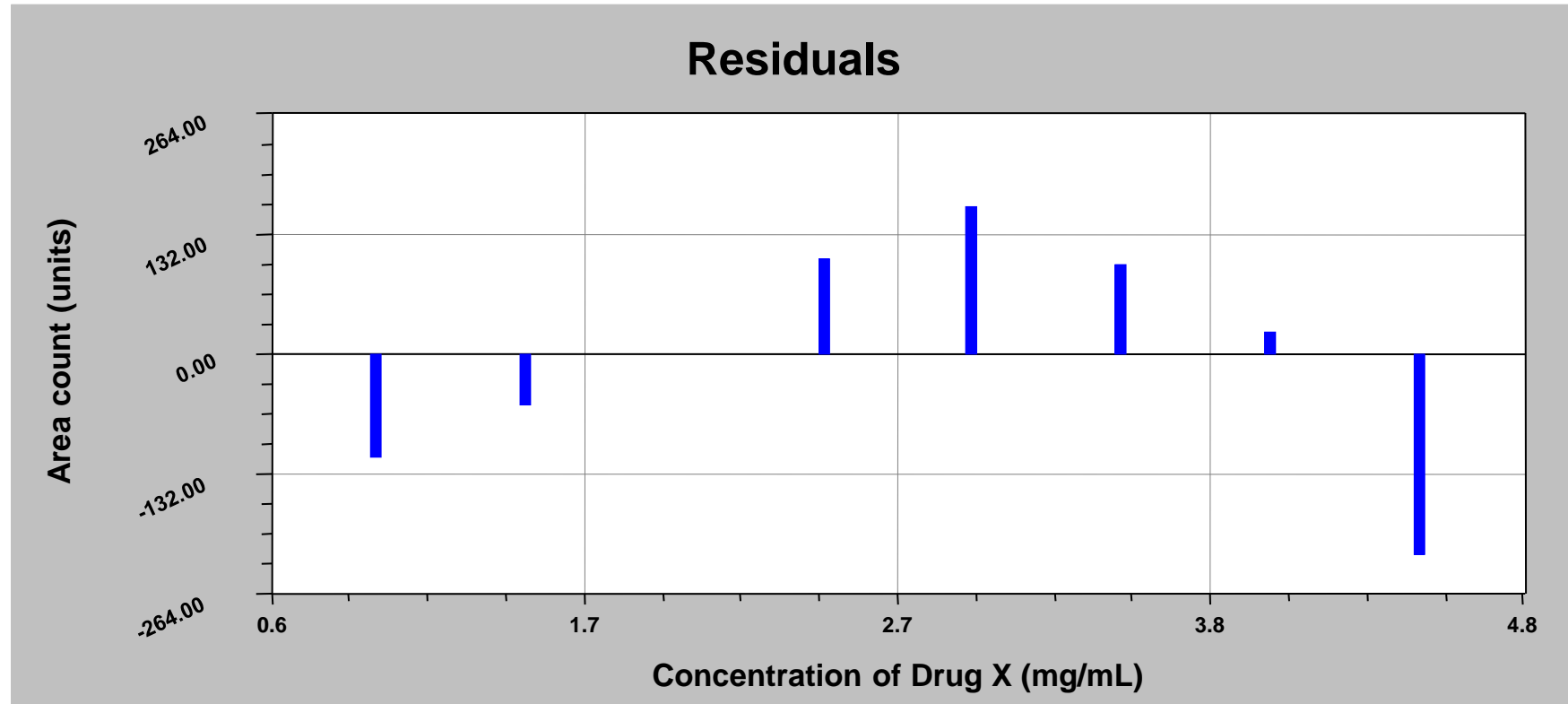
Padrão em um gráfico pode ser evidência de problemas de recuperação



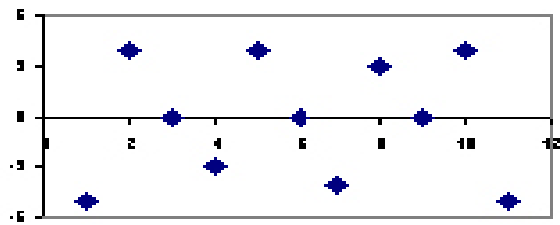
# Estimativa da Exatidão - Impurezas



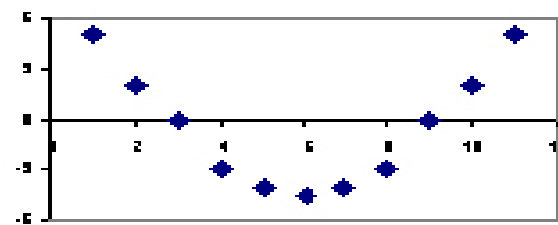
Padrão em gráfico de resíduos pode ser uma evidência de problemas de recuperação



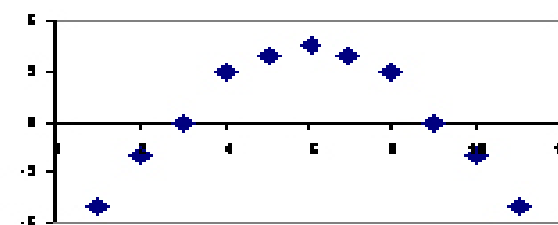
# Exemplos – Grafico Residuo



Random pattern



Non-random: U-shaped curve

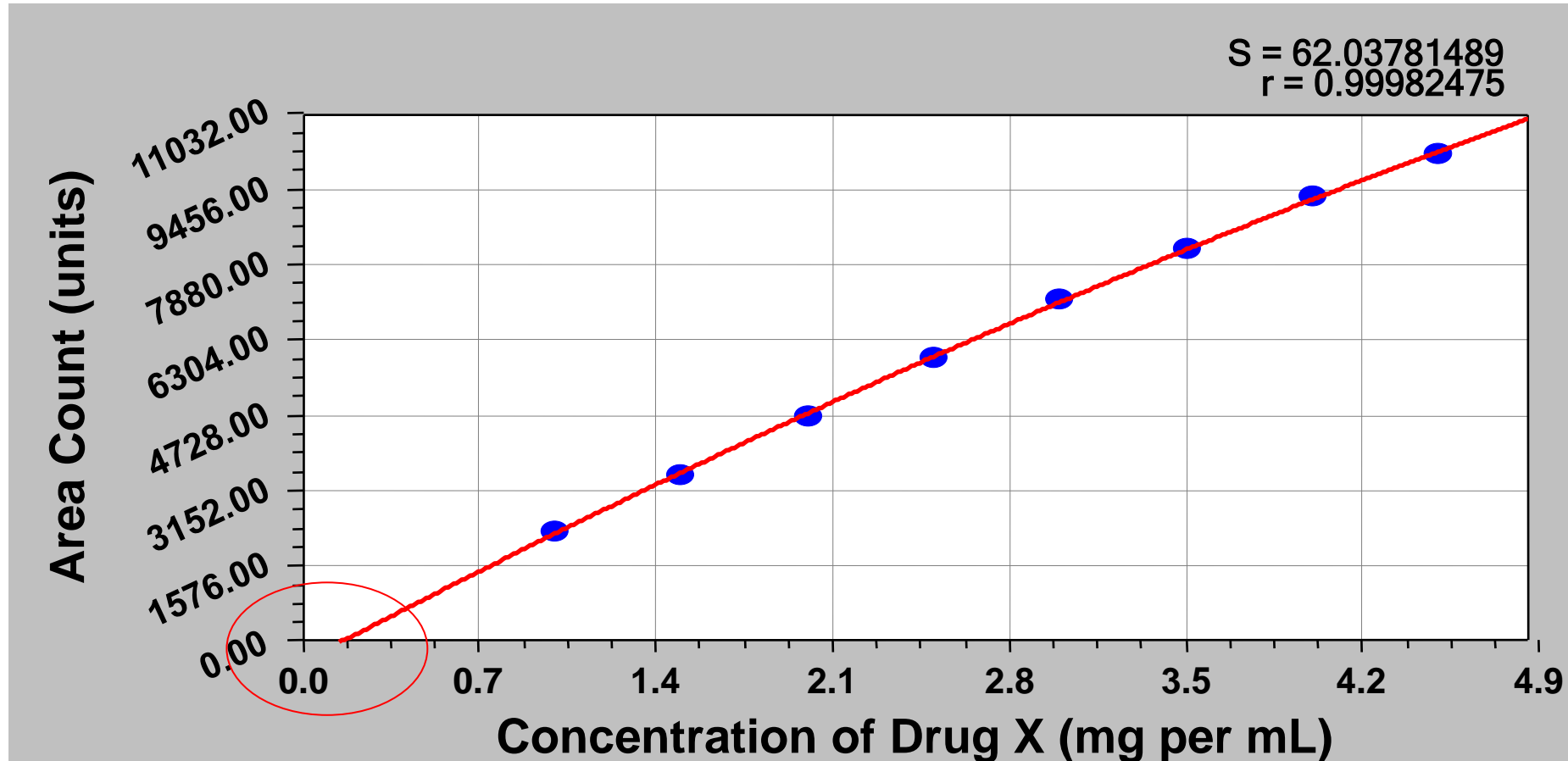


Non-random: Inverted U

# Estimativa da Exatidão - Impurezas



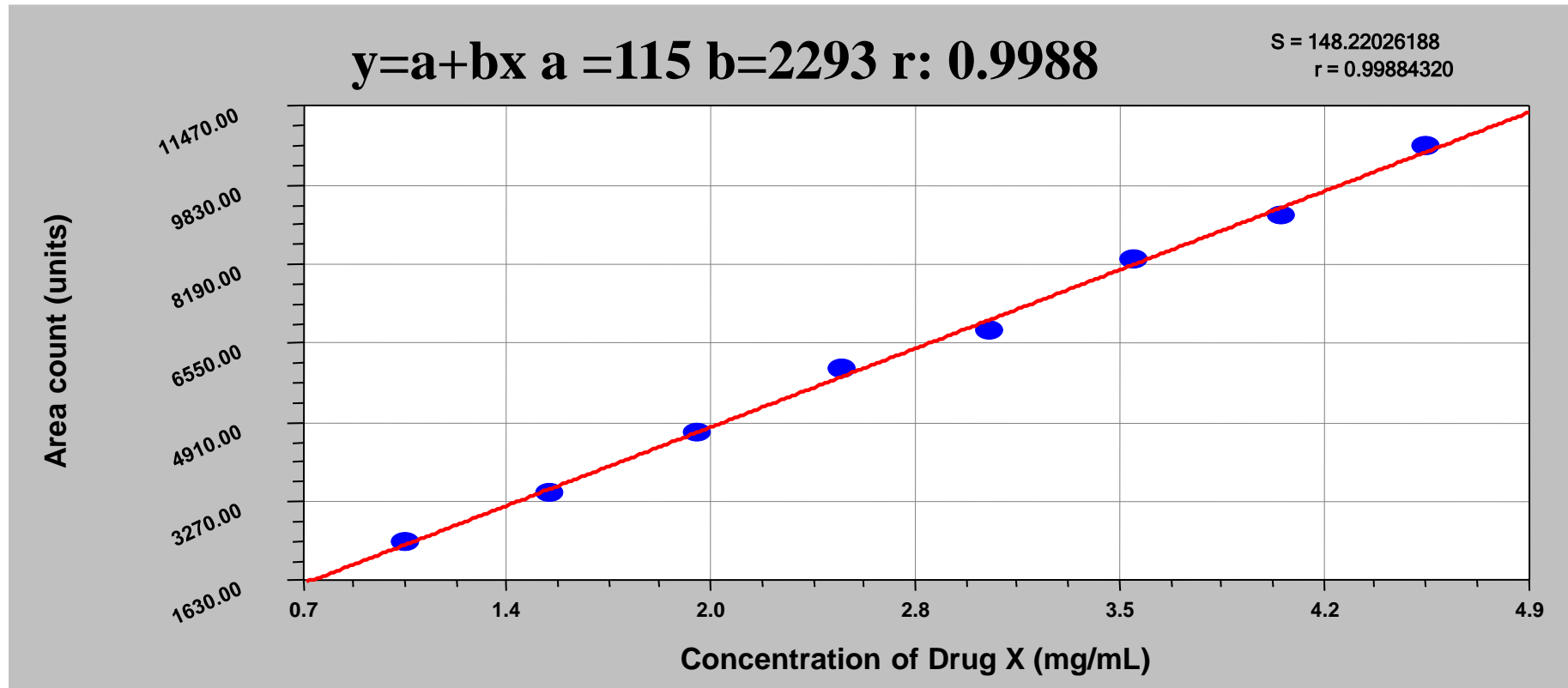
## Função quadrática mostra problemas em baixas concentrações



# Estimativa da Exatidão - Impurezas



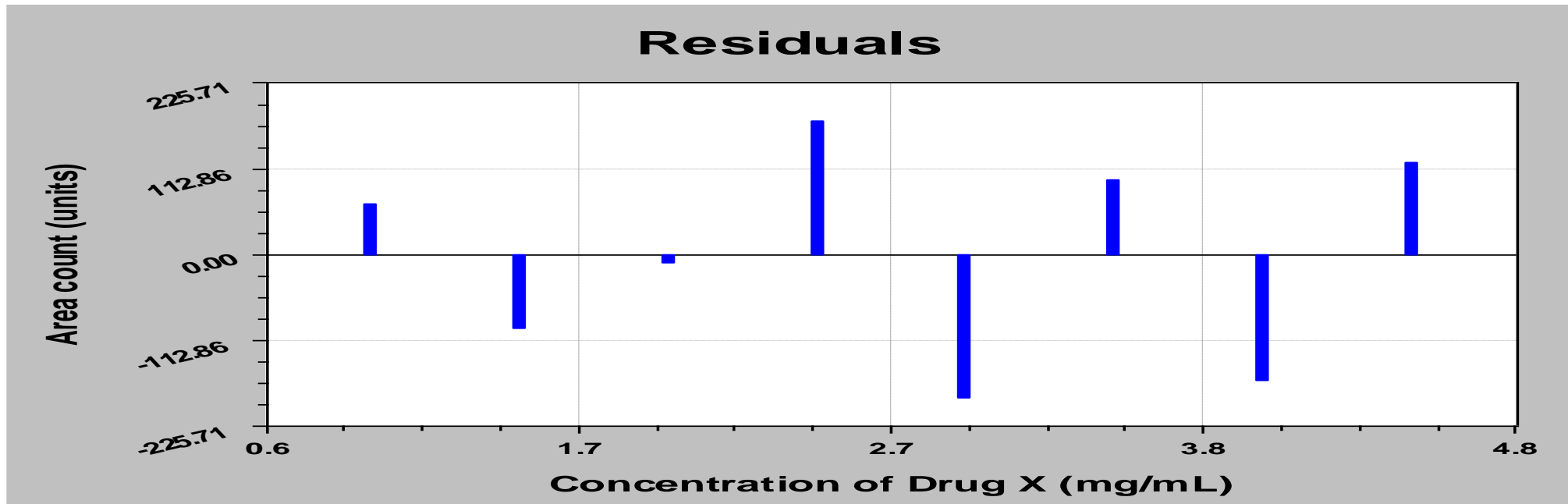
## Gráfico sem evidência de padrão



# Estimativa da Exatidão - Impurezas



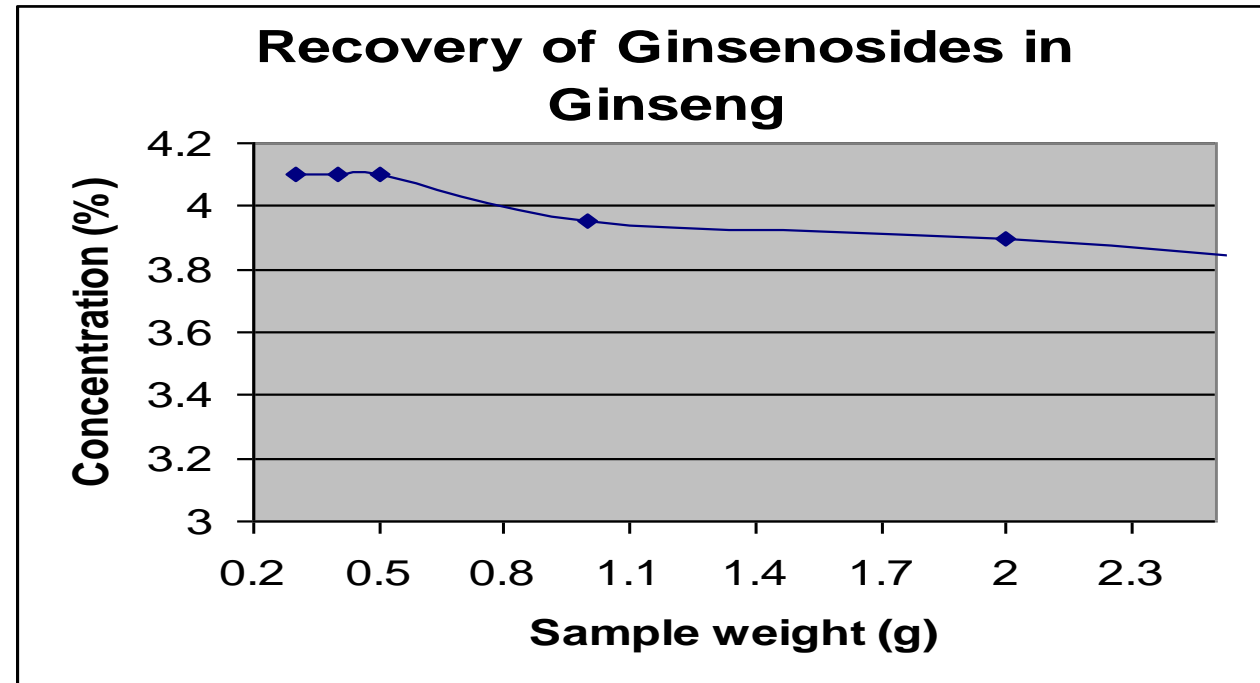
Ausência de padrão no gráfico de resíduos - Ausência de problemas





- ▶ Avaliação da exatidão é necessária quando a influência do preparo da amostra no resultado final pode ser significativa.
- ▶ Fortes interações na matriz (Botânicos e formulações de liberação modificada)
  - Avaliação da solubilidade
  - Necessidade de garantir completa recuperação através de estudos de extração e re-extração
  - Avaliação de matrizes complexas quando o valor verdadeiro é desconhecido

- ▶ Parte 1. Extração com diferentes proporções da amostra em relação ao solvente



- ▶ Determinar o peso máximo de amostra que pode ser extraído sem perda na recuperação
- ▶ Aproximação do teor da substância em análise

- ▶ Parte 2- Determinação: matrizes complexas aonde o valor verdadeiro é desconhecido
  - Extrair e re-extrair 10 replicatas com a relação amostra/solvente determinada na Parte 1
  - Teste ANOVA com 95% de confiança
  - Exatidão está validada se nenhuma diferença estatística é encontrada entre a primeira extração e a soma das extrações/re-extrações

## ▶ Parte 3- Determinação:

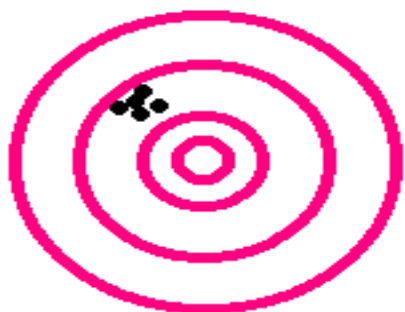
- Se há diferença entre as médias da extração e re-extração, a preparação da amostra precisa ser melhorada
  - tempo de extração maior
  - agitação diferente
  - temperatura
  - modificação do solvente

# Precisão

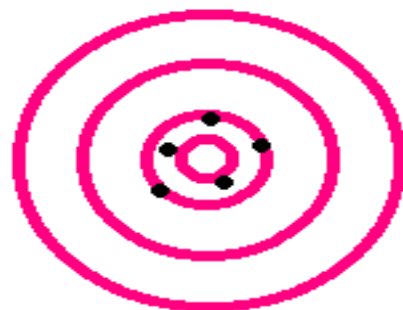


# Precisão X Exatidão

- ▶ Exatidão é expressa como % de recuperação
- ▶ Precisão é expressa como Desvio Padrão Relativo (DPR)



Preciso mas Nao exato



Exato mas Preciso



Preciso e Exato

- ▶ Grau de concordância entre resultados individuais obtidos a partir de amostra homogênea
- ▶ Precisão deve ser avaliada na faixa de linearidade especificada no método



- ▶ Exigida para
  - Teor (Categoria I)
  - Testes para Impurezas (Quantitativo, Categoria II)
- ▶ Pode ser exigido para
  - Testes de Performance (Categoria III, Dissolução)
- ▶ Não necessário para
  - Ensaio limite
  - Testes de identificação

- ▶ **Determinação-**
  - Análise de amostras individuais obtidas de uma amostra homogênea
  - Cálculo do Desvio padrão ou Desvio Padrão Relativo
- ▶ A precisão do método deve incluir todas as fontes de variação, desde o preparo da amostra até o arredondamento dos resultados finais.

- ▶ ICH e ANVISA recomendam um mínimo de 9 determinações com um mínimo de 3 concentrações dentro da faixa de quantificação testada (3 testes em 3 conc.)
- ▶ ou mínimo de 6 determinações a 100% da concentração de teste

- ▶ Repetibilidade - concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação
- ▶ Precisão Intermediária - Concordância entre os resultados dentro do mesmo laboratório mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e equipamento diferente
- ▶ Reprodutibilidade - concordância entre os resultados obtidos em laboratórios diferentes (estudo colaborativo)

## ▶ Considerações Práticas

- A habilidade em atender os critérios pode depender do equipamento utilizado
- O critério de aceitação máximo para precisão deve estar relacionado com o critério de aceitação do teor declarado ou da especificação para que resultados confiáveis possam ser obtidos (reduzir resultados fora das especificações)

# Precisão



## Repetibilidade (5 injeções)

<u>Assay Limit (%)</u>	<u>max. % RSD</u>
99.0 - 101.0	0.37 <sup>1</sup>
98.5 - 101.5	0.55 <sup>1</sup>
98.0 - 102.0	0.73 <sup>1</sup>
95.0 - 105.0	1.9 <sup>2</sup>
90.0 - 110.0	3.9 <sup>2</sup>
Impurities	5 to 25 <sup>2</sup>

▶ depending on level

<sup>1</sup> *Pharmaeuropa*, 11(4), 571-577

<sup>2</sup> *Pharm. Technol.*, 6(9), 120-137

## Precisão Intermediária

- ▶ FDA recomenda um mínimo de 2 dias diferentes com analistas diferentes
  - FDA (CDER), *Reviewer Guidance: Validation of Chromatographic Methods*, Nov. 1994
- ▶ Critério de Aceitação:
  - Realizar Test F, resultados entre labs não deve ser estatisticamente diferente
  - Tipicamente cerca de 2x repetibilidade

A diferença estatística pode não ser significativa (considerações práticas). Necessidade de avaliar considerando uso final do método.

## Exemplo 4



**Teor do fármaco X utilizando instrumentos diferentes, em dias diferentes, com analistas e laboratórios diferentes**

Measure	Set-up 1	Set-up 2
1	100.0	100.9
2	98.1	100.8
3	99.6	100.9
4	99.4	100.9
5	100.4	100.7
Avg.	99.5	100.8
% RSD	0.9	0.1

**Acceptance criteria:**  
**Means within  $\pm 1.5\%$  RSD**  
**within  $\pm 1.0\%$**

t-Test would have shown data sets 1 and 2 to be significantly different



- ▶ Análises com a mesma amostra utilizando laboratórios, analistas, dias, lotes de reagentes (mesma marca) e condições ambientais diferentes.
- ▶ Expressa como ausência de influência das variáveis ambientais e operacionais nos resultados obtidos com o método analítico

# Exemplo 5



**Table [REDACTED] Intermediate Precision Results for Assay of [REDACTED] Film-coated Tablets**

Laboratory	Operator	Date	Batch X094 0399		Batch X095 0399	
			% Found		% Found	
WSJ-360.1032	1	05 Jul 1999	99.59	99.38	99.14	99.64
WSJ-360.1036	2	02 Jul 1999	98.84	99.39	98.58	98.70
WSJ-360.910	3	24 Jun 1999	97.66	97.79	97.48	97.64
Mean				98.8		98.5
RSD (%)				0.86		0.85



- ▶ Resultados do teste em condições *normalmente* esperadas de laboratório para laboratório e de analista para analista.
- ▶ Parâmetros do teste são mantidos constantes (diferença com robustez)

## ▶ Determinação:

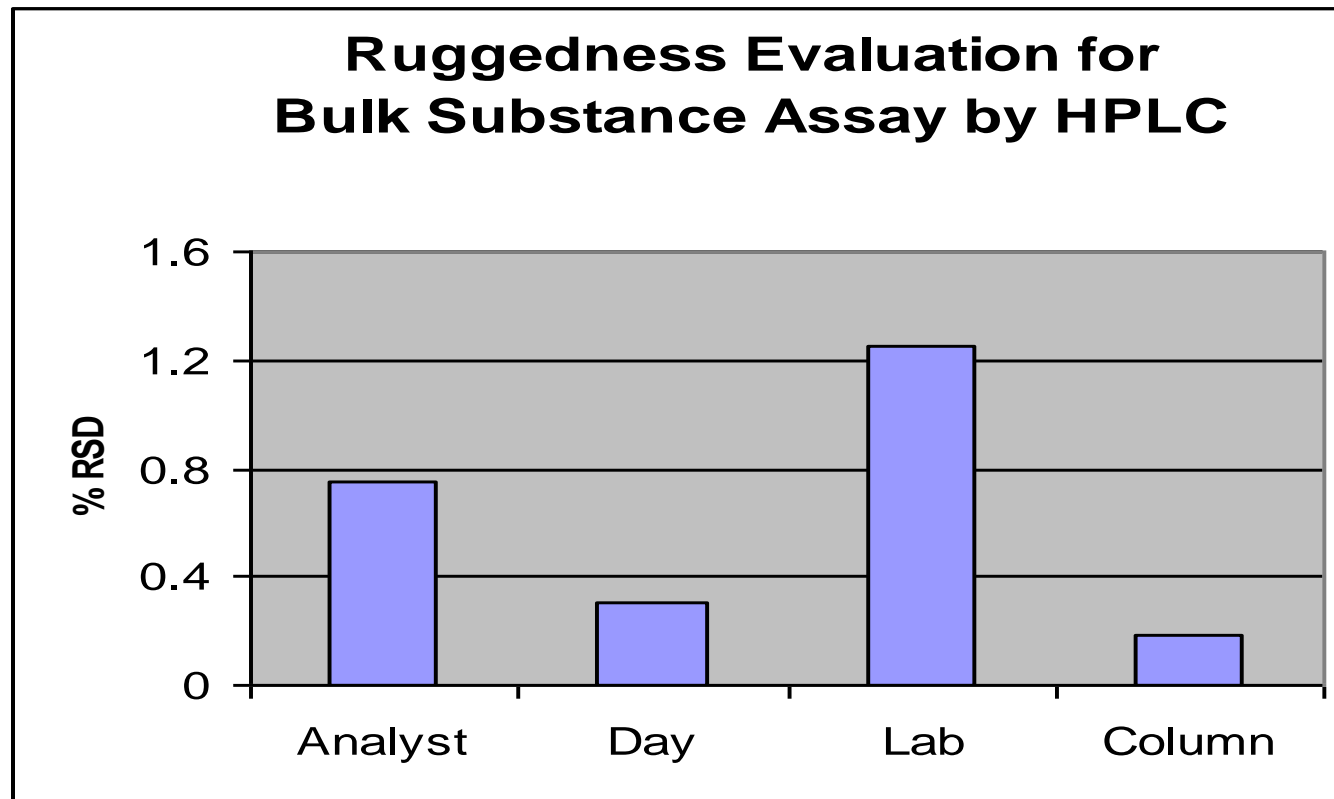
- Análise de uma amostra homogênea em laboratórios diferentes, por analistas diferentes, nas condições ambientais normalmente encontradas empregando os parâmetros específicos do método.
- O grau de reprodutibilidade dos resultados do teste é determinado em função dessas variáveis.

## ▶ Variáveis do estudo

- Analista     A, B, C
- Dias         1, 2, 3
- Lab          L, M, N
- Coluna      x, y, z

- ▶ Comparações feitas entre alguns itens. Avaliação de todas as possíveis variáveis exigiria 81 experimentos ( $3 \times 3 \times 3 \times 3$ )
- ▶ A influência de cada variável pode ser avaliada utilizando modelos experimentais multi-fator (Plackett-Burman, Hendrix, etc.)

- ▶ Grau de reprodutibilidade dos resultados do teste como uma função das variáveis



## Reprodutibilidade

- ▶ FDA: no mínimo 2 laboratórios dentro da mesma empresa
  - FDA (CDER), *Reviewer Guidance: Validation of Chromatographic Methods*, Nov. 1994
- ▶ FDA: vários laboratórios ASTM 691
  - “Standard practice for Conducting an Interlaboratory Study to Determine the Precision of a Test Method”
- ▶ AOAC protocolo 8 amostras - 8 laboratórios.
  - *Statistical Manual of the AOAC* W.J. Youden and E.H. Steiner



## Exemplo 6



### Resultados de estudo colaborativo no material G

(botânico), 10 laboratórios. Teor total de compostos marcadores.

Lab #	Replicates (mg/g)			Average	RSD
1	24.4	24.4	24.3	24.4	0.25
2	22.0	22.8	24.4	23.0	5.36
3	21.5	22.1	22.1	21.9	1.64
4	25.7	26.3	26.6	26.2	1.73
5	24.9	24.9		24.9	0.09*
6	25.1	26.8		26.0	4.41*
7	27.0	23.9	26.3	25.7	6.41
8	25.2	24.2	24.7	24.7	1.95
9	20.2	24.2	23.2	22.5	9.39
10	23.7	24.3	24.7	24.2	2.14
* RSD of two data sets not included in calculation					
Overall RSD= 6.89 %					
*Average RSD intralaboratory= 3.61 %					
RSD Interlaboratory= 6.01 %					

## ▶ Exatidão e Precisão

- Avalia a capacidade do método (desde a preparação da amostra até o arredondamento final dos resultados) em obter resultados confiáveis.
- As especificações do produto devem ser consideradas na determinação dos critérios de aceitação.

# 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](mailto:Education@usp.org)



**Empowering a healthy tomorrow**

**USP Education**