

GUIA DE VALIDACIÓN DE METODOS ANALITICOS

Definiciones:

ESPECIFICIDAD: Habilidad de evaluar inequívocamente el analito en presencia de componentes que se puede esperar que estén presentes. Típicamente éstos pueden incluir impurezas, productos de degradación, la matriz, etc.

EXACTITUD: (VERACIDAD): Expresa la cercanía entre el valor que es aceptado, sea como un valor convencional verdadero (material de referencia interno de la firma), sea como un valor de referencia aceptado (material de referencia certificado o estándar de una farmacopea) y el valor encontrado (valor promedio) obtenido al aplicar el procedimiento de análisis un cierto número de veces.

INTERVALO DE LINEALIDAD: Ámbito entre la menor y la mayor concentración de analito en la muestra (incluyendo éstas concentraciones) para las cuales se ha demostrado que el procedimiento analítico tiene el nivel adecuado de precisión, exactitud y linealidad.

LIMITE DE CUANTIFICACION: Cantidad más pequeña del analito en una muestra que puede ser cuantitativamente determinada con exactitud aceptable. Es un parámetro del análisis cuantitativo para niveles bajos de compuestos en matrices de muestra y se usa particularmente para impurezas y productos de degradación. Se expresa como concentración del analito.

LIMITE DE DETECCION: Cantidad más pequeña de analito en una muestra que puede ser detectada por una única medición, con un nivel de confianza determinado, pero no necesariamente cuantificada con un valor exacto.

Es comúnmente expresado como concentración del analito.

LINEALIDAD: Habilidad (dentro de un ámbito dado) del procedimiento analítico de obtener resultados de prueba que sean directamente proporcionales a la concentración de analito en la muestra.

MATERIAL DE REFERENCIA (PATRÓN TERCIARIO): Material o sustancia, en el cual una o más de sus propiedades están suficientemente bien establecidas para que sea usado en la calibración de un aparato, la estimación de un método de medición o para asignar valores a los materiales.

MATERIAL DE REFERENCIA CERTIFICADO (PATRÓN SECUNDARIO): Material en el que los valores de una o más de sus propiedades están certificados por un procedimiento técnicamente validado, bien sea que este acompañado de, o pueda obtenerse, un certificado u otra documentación emitida por un ente certificador.

MATERIAL ESTANDAR DE REFERENCIA (PATRÓN PRIMARIO): Material emitido por la Oficina Nacional de Normas de Estados Unidos (U.S National Bureau of Standars) cuyo nombre fue cambiado recientemente a Instituto Nacional para Normas y Tecnología (National Institute for Standards and Technology, NIST.)

METODO ANALITICO: Adaptación específica de una técnica analítica para un propósito de medición seleccionado.

PARAMETROS DE DESEMPEÑO ANALITICO: Características de validación que necesitan ser evaluadas y que típicamente corresponden a la siguiente lista: exactitud, precisión, especificidad, límite de detección, límite de Cuantificación, linealidad, intervalo de linealidad y robustez.

LIBROS OFICIALES: Los aprobados mediante el decreto 28466-S y sus modificaciones.

PRECISION: expresa la cercanía de coincidencia (grado de dispersión) entre una serie de mediciones obtenidas de múltiples muestreos de una misma muestra homogénea bajo condiciones establecidas. Puede considerarse a tres niveles: repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad.

Debe determinarse utilizando muestras originales y homogéneas. Sin embargo, si no es posible obtener una muestra homogénea puede ser determinada usando muestras preparadas o una disolución de la muestra.

PRECISION INTERMEDIA: Precisión obtenida dentro del laboratorio por diferentes analistas, diferentes equipos, días distintos con la misma muestra homogénea.

PROCEDIMIENTO ANALITICO: Forma en que se realiza el análisis. Debe describir en detalle los pasos necesarios para realizar cada prueba analítica. Puede incluir, pero no necesariamente los siguientes conocimientos: características de la muestra, preparación de los estándares de referencia y reactivos, uso de los aparatos o instrumentos, generación de la curva de calibración, uso de fórmulas para los cálculos.

PROCEDIMIENTO ANALITICO OFICIAL: Procedimiento analítico estandarizado contenido en una farmacopea oficial o libros oficiales. Se les supone validados y los laboratorios que los utilizan no están obligados a validar la exactitud de los mismos, solamente demostrar su aptitud para aplicarlos, validando la linealidad y precisión del sistema.

REPETIBILIDAD (REPETITIVIDAD): Precisión obtenida bajo las mismas condiciones de operación en un intervalo corto de tiempo (mismo día), por un mismo analista, en la misma muestra homogénea y en el mismo equipo.

REPRODUCIBILIDAD: Expresa la precisión entre laboratorios como resultado de estudios interlaboratoriales diseñados para estandarizar la metodología.

ROBUSTEZ: Medida de la capacidad de un procedimiento analítico de permanecer inafectado por pequeñas pero deliberadas variaciones en los parámetros del método y provee una indicación de su fiabilidad en condiciones de uso normales.

SELECTIVIDAD: Describe la habilidad de un procedimiento analítico para diferenciar entre varias sustancias en la muestra y es aplicable a métodos en los que dos o más componentes son separados y cuantificados en una matriz compleja.

SESGO: Se usa en el sentido de exactitud de un promedio a largo plazo (valor esperado) de una serie de promedios. Es la diferencia en el valor esperado (teóricamente igual al promedio de un número infinito de valores individuales independientes) del valor verdadero, correcto o asumido.

SISTEMA ANALITICO: Está compuesto por: equipos, reactivos, materiales, documentos, patrones, materiales de referencia, analistas y variables operativas, que se utilizan en un método de análisis.

TECNICA ANALITICA: Principio científico que se ha encontrado útil para proveer información sobre la composición de un determinado producto o material

VALIDACIÓN: Confirmación que se da por la recopilación y análisis de la evidencia objetiva de que se cumplen los requisitos particulares para el uso específico propuesto.

VALIDACIÓN DE UN PROCEDIMIENTO ANALITICO: Procedimiento para establecer por medio de estudios laboratoriales una base de datos que demuestren científicamente que un método analítico tiene las características de desempeño que son adecuadas para cumplir los requerimientos de las aplicaciones analíticas pretendidas. Implica la demostración de la determinación de las fuentes de variabilidad y del error sistemático y al azar de un procedimiento, no solo dentro de la calibración sino en el análisis de muestras reales.

1 Exactitud:

Existen diferentes maneras de determinar la exactitud, los siguientes son los más frecuentes en la literatura, y pueden ser utilizados en todos los tipos de análisis.

1.1 Comparación con un método oficial, validado o estandarizado:

Verificación

La muestra debe ser analizada, utilizando el método a validar y un segundo método bien caracterizado, el cual debe tener una exactitud bien definida y establecida. Se analizan 6 muestras por replicado a la concentración normal de trabajo por ambos métodos.

Criterio de aceptación:

Se lleva a cabo un análisis de varianza (ANOVA), del porcentaje de recuperación o del error relativo en porcentaje, para determinar si hay o no diferencia significativa entre la exactitud de los métodos comparados.

1.2 Adición estándar:

Verificación

Se puede llevar a cabo de dos maneras diferentes:

1.2.1 Con placebo:

Se utiliza una mezcla preparada en el laboratorio de todos los componentes de la matriz de la muestra sin el principio activo a determinar, luego el placebo se enriquece con estándar.

1.2.2 Con muestra:

Cuando no es posible contar con un placebo, se determina por replicado el contenido promedio del analito en la muestra con el método a validar; una vez conocido el contenido promedio se procede a enriquecer las muestras con estándar. Para preparar las soluciones, en este caso se mantiene constante la cantidad de muestra tomada y se agregan cantidades variables del estándar.

En ambos casos se preparan soluciones de placebo o de muestras enriquecidas a tres niveles de concentración diferentes, valores sugeridos en la literatura son 80, 100 y 120 % de la concentración normal de trabajo del método. ICH (International Conference Harmonization), recomienda preparar muestras independientes por triplicado a cada nivel de concentración. En el caso en que se trabaje con muestra enriquecida, para llevar a cabo el cálculo del porcentaje de recuperación, se requiere contar con los datos de contenido del principio activo en la muestra antes de la adición estándar.

Criterios de aceptación

Tabla 1

<i>Concentración del analito</i>	<i>Criterio de aceptación</i>
Ensayo	
	<p>1. Placebo enriquecido</p> <ul style="list-style-type: none">• Porcentaje de recuperación esperado debe encontrarse entre el 98%-102%. Lo cual es equivalente a ± 2 % de error relativo.• Al graficar la cantidad recuperada contra la cantidad adicionada, debe obtenerse un coeficiente de correlación de 1.00, una pendiente de 1.00 y el intercepto debe ser 0.00. Lo cual puede ser corroborado estadísticamente. <p>2. Muestra enriquecida</p> <ul style="list-style-type: none">• Los porcentajes de recuperación obtenidos, deben encontrarse dentro del $100\% \pm 4S$, donde S es la mayor desviación estándar obtenida en la determinación de la precisión del método o del

	<p>sistema</p> <ul style="list-style-type: none"> Al graficar la respuesta del ensayo (cantidad total encontrada), contra la cantidad de analito adicionada, la pendiente debe ser mayor o igual a 0.95 y el intercepto debe ser igual a la concentración inicial.
Trazas	
Sobre 100 ppb (ng/ L)	80%-100% de recuperación
Menos de 100 ppb (ng/ L)	60%-110 % de recuperación
Menos 1 ppb	70%-120% de recuperación

1.3 Comparación de las curvas de regresión lineal de estándares con curvas de regresión lineal de placebos enriquecidos (métodos de curvas de respuesta relativa):

Verificación

Este método es una modificación del método de adición estándar a placebo. Se preparan soluciones a diferentes niveles de concentración de placebo enriquecido (80, 100, 120%) y soluciones de estándares a los mismos niveles de concentración. Separadamente se evalúa la regresión lineal de ambos grupos y se lleva a cabo la comparación de las pendientes y los interceptos.

Criterio de aceptación:

Los efectos de la interacción entre la matriz y el analito, se encuentran ausentes si los interceptos del placebo enriquecido y los estándares son estadísticamente iguales a cero, (información que a la vez permite establecer la especificidad del método respecto a la matriz). El error sistemático proporcional se encuentra ausente si la razón de las pendientes de las curvas de respuesta para el placebo y los estándares es estadísticamente equivalente a 1.

1.4 Comparación de los resultados obtenidos de un estándar o material de referencia certificado:

Verificación

El material de referencia puede ser obtenido en el mercado por algún proveedor o puede ser preparado internamente en el laboratorio. Se analiza por replicado el material, por el método a validar y se compara el resultado obtenido con el valor verdadero declarado, este método se encuentra limitado por la disponibilidad y la

estabilidad del material de referencia, así como por el grado de certidumbre que se tenga del valor verdadero de la concentración del material de referencia.

Criterio de aceptación

98%-102% de recuperación o 2% de error relativo

2 Precisión

Verificación

Existen diferentes formas de evaluar la precisión: repetibilidad, precisión intermedia, reproducibilidad

En términos generales la precisión, debe determinarse, analizando un número suficiente de alícuotas, que permitan calcular estadísticamente la desviación estándar y la desviación estándar relativa. La ICH, recomienda llevar a cabo un total de nueve determinaciones, que cubran el intervalo especificado en el procedimiento. Para ello se pueden trabajar tres niveles diferentes de concentración (80, 100, 120 %), con tres muestras independientes de cada nivel. Datos con los que se cuenta si al evaluar la exactitud, se llevó a cabo por el método de Adición estándar. Otra forma de evaluarlo es, analizando por lo menos seis muestras independientes a la concentración normal de trabajo.

Criterios de aceptación:

Existen diferentes criterios de aceptación, sin embargo se puede generalizar que en el caso de la repetibilidad y la precisión intermedia la desviación estándar relativa, para evaluar la precisión del sistema o del método debe ser menor o igual al 2 %, y en algunos casos puede ser igual o menor del 3%, la reproducibilidad, puede ser 2 o 3 veces la repetibilidad.

3 Linealidad e intervalo

Verificación

El comportamiento lineal de un método, debe ser demostrado dentro del intervalo en el cual es probable que se trabaje. Este intervalo varía dependiendo del tipo de determinación a realizar. Por esta razón se establece los intervalos dentro de los cuales deben llevarse a cabo las pruebas para cada análisis:

Tabla 2

Análisis	Intervalo de trabajo
Ensayo del principio activo	80-120 % de la concentración de trabajo
Determinación de impurezas	50-120% de la especificación
Ensayo de Uniformidad de contenido	70-130% de la concentración de trabajo, o alguna modificación del mismo, dependiendo de la naturaleza de la forma dosificada

Prueba de disolución	± 20 % sobre la especificación, en el caso de la liberación controlada, en que existe una especificación mínima al inicio de la prueba y una máxima al finalizar, el intervalo debe ser menos un 20% de la especificación mínima y más 20% de la especificación máxima.
----------------------	---

Para llevar a cabo la determinación de la linealidad y el intervalo, se deben seguir los siguientes pasos:

3.1 Linealidad e intervalo del sistema:

Verificación

1. Preparar en forma independiente soluciones de estándar al menos 5 niveles de concentración, las cuales deben encontrarse dentro de los intervalos establecidos para cada tipo de análisis.
2. Este procedimiento debe repetirse en forma independiente por lo menos 3 veces, para evaluar estadísticamente la regresión lineal del sistema.
3. Con estos datos se grafica la respuesta de la medición, contra la concentración del analito. Se verifican datos con comportamiento atípico mediante mediciones adicionales.
4. Realizar un análisis de varianza de la regresión lineal
5. Calcular el coeficiente de regresión (calcular por lo menos tres curvas independientes)
6. Calcular y graficar los residuos (valor real de la concentración – el calculo por la ecuación de regresión para cada valor de X)

3.2 Linealidad e intervalo del método

Verificación

1. Preparar soluciones de muestra o placebo enriquecidos a cinco niveles de concentración, los cuales deben encontrarse dentro de los intervalos establecidos por la USP para cada tipo de análisis, y que fueron verificados previamente al llevar a cabo la determinación de la linealidad del sistema.
2. Este procedimiento debe repetirse en forma independiente por lo menos 3 veces, para evaluar estadísticamente la regresión lineal del método
3. Con estos datos se grafica la respuesta de la medición, contra la concentración del analito. Se verifican datos con comportamiento atípico mediante mediciones adicionales.
4. Realizar un análisis de varianza de la regresión lineal
5. Calcular el coeficiente de regresión con la totalidad de los datos (por los menos tres curvas independientes)
6. Calcular y graficar los residuos (valor real de la concentración – el calculado por la ecuación de regresión para cada valor de X)

Criterios de aceptación

Se confirma linealidad si se cumplen los siguientes criterios:

1. Homocedasticidad (la varianza es constante para todas las concentraciones)
2. El Análisis de varianza de la regresión lineal debe demostrar:
 - a- paso del intercepto por cero, mediante un test de t o mediante el intervalo de confianza con un α de 0.05.
 - b- desviación no significativa con respecto a la regresión
3. Distribución aleatoria de los residuos (Tendencias sistemáticas son indicativas de no linealidad)
4. El coeficiente de correlación de la regresión lineal debe encontrarse entre 0.98 y 1.00, el coeficiente de correlación al cuadrado debe ser mayor de 0.995

4 Límite de detección

El límite de detección puede ser establecido de diferentes maneras dependiendo del tipo de método:

4.1 Métodos no instrumentales

4.1.1 Por comparación de blanco y blanco enriquecido a una sola concentración.

Verificación

El límite de detección se determina por medio del análisis comparativo de un blanco y de muestras independientes de blanco enriquecido con diferentes niveles de concentraciones conocidas del analito. Se compara el comportamiento de las muestras con el blanco y se establece el nivel mínimo al cual el analito puede ser realmente detectado. En el caso del límite de detección del sistema, el blanco está constituido por los solventes utilizados en el análisis. En el caso del método, el blanco está constituido por los solventes y por la matriz de la muestra.

4.2 Métodos instrumentales

En el caso de métodos establecidos como oficiales casi nunca es necesario determinar el límite actual de detección. Preferiblemente el límite de detección de trabajo debe ser más bajo del nivel de detección requerido por la especificación. Por ejemplo, si se requiere detectar una impureza al nivel del 0.1%, se debe demostrar que el procedimiento realmente detecta la impureza a este nivel.

Existen diferentes formas de determinar el límite de detección, cualquiera que sea el método utilizado, se requiere del análisis de un número adecuado de muestras conocidas que deben estar cercanas o preparadas a la concentración del límite de detección requerido para el tipo de ensayo a realizar.

4.2.1 Por comparación de blanco y blanco enriquecido a una sola concentración.

Determinación

Se utiliza cuando la desviación estándar del blanco es diferente de 0. Se preparan no menos de 10 blancos independientes y 10 blancos enriquecidos a la concentración más baja aceptada. Una vez preparadas las soluciones, se llevan a cabo las mediciones de cada una y posteriormente se calcula la desviación estándar de cada grupo de datos.

Con estos datos se puede calcular el límite de detección

$$LD = \text{Valor promedio del blanco} + 3S$$

Donde S es la desviación estándar de la muestra enriquecida

4.2.2 Blanco enriquecido a una sola concentración

Determinación

En este caso se analizan y cuantifican no menos de 10 soluciones de blanco enriquecidas o muestras enriquecidas preparadas a la concentración menor para la que se puede obtener un grado aceptable de incertidumbre. Se lleva a cabo la cuantificación para cada una de las soluciones, se calcula el valor promedio de las concentraciones obtenidas y la desviación estándar.

$$LD = \text{Concentración promedio obtenida para el blanco o la muestra enriquecida} + 4.65 S$$

4.2.3 Comparación del comportamiento de blanco con blanco enriquecido a diferentes concentraciones

Determinación

Se preparan soluciones independientes de blanco y de blanco enriquecido a diferentes niveles de concentración bajos, cercanos al límite de detección esperado. Se determina aquella concentración a la cual la señal del analito es igual a la señal del blanco (C_a). Se calcula el límite de detección. Puede calcularse de dos maneras.

$$1. LD = C_a + 2 S$$

Donde:

- ◆ C_a es la concentración del analito determinada
- ◆ S la desviación estándar del blanco

2. Se debe construir la regresión lineal de los blancos enriquecidos para determinar el valor de la pendiente (m), también debe calcularse el valor promedio de la señal del blanco y su desviación estándar. Con estos datos se calcula el límite de detección de la siguiente manera

$$L.D. = \frac{S_m - \bar{S}_{bl}}{m} \quad S_m = \bar{S}_{bl} + K S_{bl}$$

S_m se puede determinar realizando 20-30 medidas del blanco preferiblemente a lo largo de un período de tiempo extenso.

\bar{S}_{bl} = señal media del blanco

S_m = señal analítica mínima distinguible

S_{bl} = Desviación estándar del blanco

m = pendiente de la regresión lineal

K = múltiplo de la desviación estándar del blanco, valores recomendados en la literatura son 2 o 3

4.2.4 Determinación del corredor de error

Determinación

Se preparan de 7 a 10 soluciones independientes, a tres niveles de concentración (baja, intermedia y alta).

Se construye el corredor de error a un nivel de confianza adecuado 95%, graficando la concentración versus la señal obtenida. Utilizando para ello un programa estadístico apropiado.

4.2.5 Método de comparación Señal / Ruido

Determinación

En el caso de procedimientos analíticos instrumentales que están sujetos a ruido de fondo, los documentos de la International Conference Harmonization describen una aproximación común que consiste en comparar las señales de muestras con concentraciones bajas (conocidas) del analito, contra las señales del blanco.

Se preparan muestras de concentración baja conocida a diferentes niveles de concentración, de acuerdo con el método en estudio. Se prepara un blanco, y se miden las señales de las soluciones preparadas.

El Límite de detección corresponde a la concentración mínima a la cual el analito es detectado con una relación señal ruido de 2:1 o 3:1

5 Límite de cuantificación

5.1 Métodos no instrumentales

5.1.1 Con muestras preparadas

Determinación

Se preparan varias muestras de concentraciones conocidas del analito en análisis. Se analiza cada una de las muestras preparadas por el método en estudio.

El límite de cuantificación es la mínima concentración cuantificable con una precisión y exactitud aceptable. (ver tabla 1)

5.2 Métodos instrumentales

5.2.1 Con muestras preparadas

Se procede de la misma manera que en el caso de los métodos no instrumentales.

5.2.2 Método de comparación de Señal / Ruido

Determinación:

Se preparan muestras de concentración conocida a bajos niveles, de acuerdo al método en estudio. Se prepara un blanco, y se mide la señal de las soluciones preparadas.

El límite de cuantificación es la concentración de analito en la que se pueden dar cualquiera de las siguientes situaciones:

- Relación señal / ruido es 10:1.
- Relación señal / ruido es al menos 10 y la precisión de menos de 10% (Desviación estándar relativa)
- Relación señal / ruido es mayor de 20 y la precisión menor de 5% (Desviación estándar relativa)

5.2.3 Método de respuesta de línea base (cromatografía líquida o gaseosa)

Determinación

Se debe preparar una solución de blanco y se corre el cromatograma por un tiempo igual a 20 veces el ancho del pico obtenido para el analito.

Se obtiene la medida de ruido como:

- La más grande fluctuación pico a pico
- La desviación más grande (positiva o negativa) de la respuesta media

Se calcula el límite de cuantificación, utilizando la siguiente fórmula:

$$LC = 10 \times \text{Desviación mínima} \times \text{la pendiente de la curva de calibración.}$$

Donde la pendiente de la curva de calibración se obtiene del estudio de linealidad del método.

5.2.4 Método de la inyección doble de la muestra de analito

Determinación

Se preparan muestras del analito a bajas concentraciones. Se llevan a cabo dos corridas para cada una de las soluciones.

Se calcula el Límite de cuantificación como la concentración más baja del analito a la cual la desviación estándar relativa de las dos mediciones es $\leq 2\%$

6 Especificidad

La especificidad puede verificarse de diferentes maneras, dependiendo del tipo de análisis a realizar. Es importante tomar en cuenta, que en aquellos casos en que la matriz de la muestra es variable, tanto en términos de su composición (productos

biológicos o de origen natural), así como en la fuente de las materias primas que las componen (diferentes proveedores, diferentes orígenes), se recomienda que la especificidad se establezca para las diferentes composiciones o fuentes en forma independiente.

6.1 Análisis Tipo I: Potencia, disolución y uniformidad de contenido.

Se puede demostrar de diferentes maneras:

6.1.1 Comparación del comportamiento de la matriz o impurezas con respecto al comportamiento del estándar.

Verificación

Se prepara una solución estándar del analito a la concentración esperada en el procedimiento de ensayo, y una solución de matriz a la misma concentración relativa. Se lleva a cabo una comparación de las mediciones de ambas soluciones.

Criterio de aceptación

La matriz no debe presentar ningún tipo de señal que interfiera con la señal que se encuentra para el estándar.

6.1.2 Comparación del comportamiento de muestra con respecto al comportamiento del estándar.

Verificación

Se prepara una solución estándar del analito a la concentración esperada en el procedimiento de ensayo y una solución de muestra a la misma concentración. Se lleva a cabo una comparación de las mediciones de ambas soluciones.

Criterio de aceptación

La muestra no debe presentar ningún tipo de señal que interfiera con la señal que se encuentra para el estándar.

6.1.3 Comparación del comportamiento de muestra enriquecida con matriz con respecto al comportamiento de estándar enriquecido con matriz.

Verificación

Se prepara una solución estándar del analito a la concentración esperada en el procedimiento de ensayo, y una solución de muestra a la misma concentración. Ambas soluciones son enriquecidas con una cantidad equivalente de matriz. Se lleva a cabo una comparación de las mediciones de ambas soluciones enriquecidas.

Criterio de aceptación

El criterio de aceptación es que el comportamiento de las muestras enriquecidas y del patrón enriquecido, debe ser lo más cercano posible, en aquel punto en que se lleva a cabo la medición del analito. Lo cual es indicativo de que la matriz, no aporta ningún tipo de señal que interfiera con la medición.

6.1.4 Comparación del comportamiento de muestras enriquecidas con analito con respecto al comportamiento de estándar enriquecido con analito.

Verificación

Se prepara una solución estándar del analito a la concentración esperada en el procedimiento de ensayo, y una solución de muestra a la misma concentración. Ambas soluciones son enriquecidas con una cantidad equivalente de analito. Se lleva a cabo una comparación de las mediciones de ambas soluciones enriquecidas.

Criterio de aceptación

El criterio de aceptación es que el comportamiento de las muestras enriquecidas y del patrón enriquecido, debe ser lo más cercano posible, en aquel punto en que se lleva a cabo la medición del analito. Lo cual es indicativo de que la matriz, no aporta ningún tipo de señal que interfiera con la medición.

Algunos autores recomiendan enriquecer tanto las muestras como el patrón con cinco niveles de concentración del analito, y llevar a cabo la comparación del comportamiento de las soluciones a los diferentes niveles. Esto permitiría determinar el grado de interferencia, dependiendo de la concentración del analito a determinar. Estos datos pueden obtenerse del estudio de linealidad del método utilizando la adición estándar.

6.1.5 Procedimientos adicionales para verificar la especificidad, pueden ser:

- a. Ensayo de la pureza de pico, cuando se cuenta con un detector de arreglo de diodos o con espectrometría de masas.
- b. Reanálisis del pico, cuando el analito de interés es recogido y reanalizado bajo diferentes condiciones cromatográficas o con métodos sensitivos a la estructura del analito
- c. Comparación de resultados obtenidos cuando la muestra puede ser analizada por dos o más métodos de separación o de detección.

6.2 *Análisis Tipo II: Pruebas cuantitativas para la determinación del contenido de impurezas o de valores límites para el control de impurezas*

6.2.1 Adición estándar de impurezas a la muestra:

Verificación

Este método se utiliza, si se encuentran disponibles en el mercado los patrones correspondientes a las impurezas. Se agrega a la muestra, diferentes concentraciones de impurezas, a la concentración normal de trabajo

Criterio de aceptación

Se debe demostrar que el contenido de impurezas determinado en el ensayo tienen una exactitud y precisión apropiadas para el método al límite de cuantificación.

6.2.2 Comparación de métodos

Verificación

En los casos en que los patrones de impurezas no están disponibles, la especificidad puede ser demostrada por comparación de los resultados del ensayo con el método propuesto, con resultados obtenidos por un segundo método bien caracterizado u oficial.

La comparación debe incluir muestras almacenadas bajo condiciones extremas relevantes (luz, calor, humedad, hidrólisis ácida o básica, oxidación). Estas condiciones deben ser escogidas de acuerdo a la estructura química del analito, que determinará la susceptibilidad del mismo a la descomposición.

Criterio de aceptación

En el caso de la determinación cuantitativa de impurezas, se deben comparar los resultados obtenidos por ambos métodos.

En el caso de pruebas de impurezas cromatográficas, se deben comparar los perfiles de impurezas.

6.3 Análisis tipo IV: Pruebas de identificación

Verificación

Deben prepararse:

1. Muestras que contengan el analito a identificar
2. Muestras que no contengan el analito (matriz)
3. Muestras sin analito pero contaminadas con una sustancia de estructura similar
4. Solución de patrón de la sustancia a identificar, preparado a una concentración equivalente a las anteriores.

Las tres primeras soluciones se comparan con la cuarta solución.

Criterio de aceptación

Deben obtenerse los siguientes resultados para cada solución

1. La solución 1 Identificación positiva
2. La solución 2 Identificación negativa
3. La solución 3 Identificación negativa.

Bibliografía

ICH- Technical Coordination- R. Bass, (1998); ICH Topic Q1A Stability testing Guidelines: Stability testing of new drug substances and product.

ICH-FDA Guidelines For the photostability testing of new drug substances and products; availability; notice Federal Register vol. 62 N°95 (05,1997)

ICH-FDA Guidelines availability: Impurities in new drug substances; notice. Federal Register Vol. 61. N° 3 (01,1996)

ICH Impurities: Guideline for residual solvents (07,1997)

ICH Impurities: Guideline for residual solvents (07,1997)

ICH Viral safety evaluation of biotechnology products derived from cell lines of human animal origin (03,1993)

ICH-FDA Availability of draft Guideline on quality of biotechnological/biological products. Derivation and characterization of cell substrates, Used for producción of biotechnological/ biological products, notice. Federal Register vol. 62N85 (03,1997)

FDA. US Department of health and human services. Guidance for industry bioanalytical Methods, validation for human studies. (12, 1998)

Centro de electroquímica y energía. Programa de capacitación actualización profesional UCR. Definitions in method validación, traceability and uncertainty.

EURACHEM, The fitness for purpose of analytical methods, First English Edition 1998.

Colegio federado de químicos y de ingenieros químicos de Costa Rica, Ingeniería y ciencia química, Actualidad de los Farmacos, Camaleón Editores, S.A. 1998

Introducción a la HPLC Capitulo 12 Validación de métodos Pag. 302-328.

Taylor, John K. Validation of Analytical Methods. Analytical Chemistry, Vol. 55 N° 6 (05,1993).

