

Trabajo final integrador:

Validación del método analítico de un fármaco antiretroviral

Alumno: Juan Manuel Fernandez.

Posgrado: Especialización en Calidad Industrial.

A. Objetivo y alcance:	2
B. Descripción de la compañía y análisis del contexto:	2
C. Validación de las técnicas analíticas:	2
Especificidad:	3
Linealidad:	4
Precisión:	5
Exactitud:	7
Robustez:	7
Límite de detección y cuantificación:	9
D. Conclusión y reflexión final:	11
E. Bibliografía y material consultado:	11
Anexos	12
Diagramas de Flujo:	12
Diagrama de Ishikawa: factores influyentes en la incertidumbre de la metodología analítica de valoración de un fármaco.	17

A. Objetivo y alcance:

En el presente trabajo final integrador se presentará el modo en que la compañía lleva a cabo la validación de los métodos analíticos de acuerdo a normativas y recomendaciones tales como ICH (International Conference of Harmonisation) y USP (United States Pharmacopeia) lo cual implica el esquema MNPQ acompañado con una gestión de la calidad. Para el desarrollo del presente trabajo se tomaron datos y resultados de la validación de la técnica analítica del principio activo Tenofovir.

B. Descripción de la compañía y análisis del contexto:

La compañía es un laboratorio farmacéutico que se especializa en los tratamientos especiales tales como HIV y oncología. La compañía cuenta con filiales en Perú, Chile, Bolivia, Brasil, Paraguay, Uruguay y Ecuador. En Argentina el laboratorio cuenta con 3 plantas separadas físicamente, una de las mismas elabora medicamentos inyectables oncológicos; mientras que las 2 restantes están abocadas a la elaboración de cápsulas y comprimidos (una planta exclusivamente de oncológicos y la restante manufactura fármacos para el tratamiento de HIV).

Dado que el laboratorio abastece tanto mercado interno como una parte del mercado sudamericano (Peru, Chile, Uruguay, Brasil, Ecuador, Colombia, Paraguay, Bolivia) debemos estar actualizados constantemente a las normativas sanitarias internacionales.

Actualmente dentro de la estructura del laboratorio dentro del área de Aseguramiento de Calidad está contemplada un área de Validaciones se encarga de mantener todas las técnicas analíticas validadas debido a que constantemente los métodos de análisis oficiales sufren modificaciones. Tanto las autoridades sanitarias locales como del exterior demandan asiduamente la validación de las técnicas analíticas por cada modificación de las técnicas de análisis por lo que resulta fundamental que se encuentren debidamente actualizadas y validadas. Para poder ejecutar todas las validaciones el área de Validaciones cuenta con un laboratorio físico-químico con balanzas, varios equipos de HPLC y demás equipamiento necesario para llevar a cabo las validaciones.

Todos los productos elaborados son sometidos a validaciones de proceso de acuerdo a las normativas locales e internacionales. En los anexos se adjuntan diagramas de flujo para la elaboración de comprimidos e inyectables.

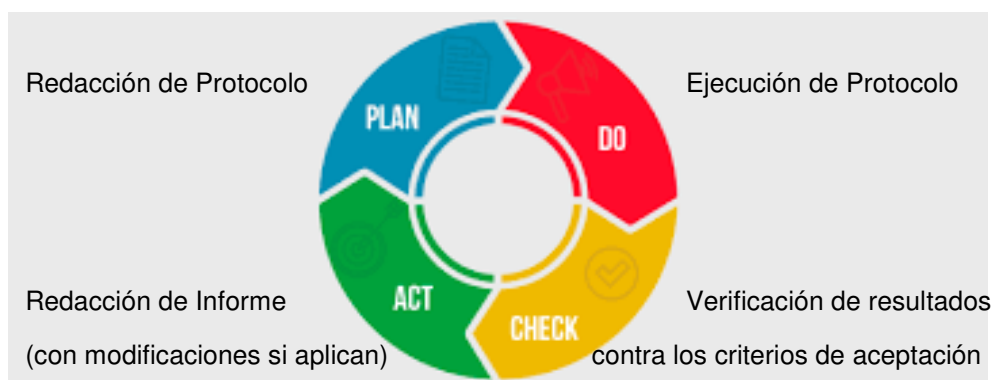
C. Validación de las técnicas analíticas:

La industria farmacéutica se basa en las guías mencionadas para la validación de las técnicas analíticas pero actualmente no hay guías para la estimación de incertidumbre de técnicas analíticas como por ejemplo en una valoración (potencia) del principio activo. Algunas autoridades sanitarias del exterior que auditan según sus BPL (buenas prácticas de laboratorio) exigen la estimación de incertidumbre pero aún no hay guías oficiales que se trabajen en la industria farmacéutica que den lineamientos para dicha estimación. *Este tema se tratará en una próxima instancia (maestría) para desarrollar una técnica y lineamientos que permitan la estimación de la incertidumbre de una técnica analítica de un fármaco.* (Se adjunta en los anexos un diagrama de Ishikawa donde se identificaron los factores que influyen sobre la incertidumbre de una metodología analítica)

En la industria farmacéutica, para la validación de las técnicas analíticas se siguen los lineamientos de “ICH: Q2 (R1) Validation of analytical procedures” en la cual se detalla como llevar a cabo la validación de la técnica analítica de acuerdo al análisis de parámetros propios del método como son: especificidad, linealidad, precisión (repetibilidad, precisión intermedia, reproducibilidad), exactitud, límite de detección, límite de cuantificación, robustez. La técnica de análisis para ser válida deberá cumplir con los criterios de aceptación para todos los parámetros evaluados.

El sector de validaciones posee un plan de validación de técnicas analíticas que es emitido al comienzo del año una vez revisado y aprobado pasa a ejecución. Próximo a la fecha de la validación se debe plantear un protocolo de validación, donde se especifican los parámetros a ensayar, como ensayar los mismos, los criterios de aceptación para cada parámetro, la bibliografía a consultar, los equipos y materiales a utilizar. Una vez emitido, revisado y aprobado el protocolo de validación, ya se encuentra listo para ser ejecutado.

Durante la ejecución del protocolo de validación todos los datos deben volcarse al cuaderno del analista y en el caso de datos que se guarden en medios informáticos (por ejemplo cromatogramas) se debe detallar la ruta de ingreso a la carpeta donde se encuentran alojados. Con todos los datos y resultados obtenidos luego de ejecución de todo el protocolo se procede a la redacción del informe. En el mismo se deben exponer todos los resultados obtenidos (incluyendo data cruda, datos primarios, ticket de balanzas por ejemplo, etc) las desviaciones que se encontraron durante la ejecución de los ensayos, los operadores que intervinieron en el ensayo, el grado de cumplimiento de los criterios de aceptación de cada ensayo, y por último se debe redactar una conclusión final donde se determinará si la técnica analítica está validada o no, o si se deben introducirse cambios. El informe deberá ser revisado y aprobado. Si deben introducirse cambios en la técnica se deberá redactar nuevamente otro protocolo y se procederá a la ejecución del mismo. Toda validación sigue el esquema PDCA.



A continuación se desarrollarán los parámetros evaluados en la validación de las técnicas analíticas:

Especificidad:

Similar al concepto de selectividad según VIM, consiste en verificar la capacidad de la técnica analítica en determinar el analito (en este caso el principio activo) en presencia de otros componentes tales como los productos de degradación, placebos, etc. Para ello se procede a la degradación forzada del analito y evaluar con qué capacidad el método detecta al mismo.

En el caso analizado de Tenofovir cabe destacar que el producto se presenta en comprimidos. En la validación de la técnica analítica se procede a llevar a cabo una degradación del producto en forma sólida mediante una fotólisis (exposición a rayos UV por el término de 24 hs) y una termólisis (exposición a 70°C durante 4 hs). Por otro lado, se llevará a cabo degradaciones en

forma líquida del producto con tratamientos alcalinos, ácidos, oxidantes, térmicos y lumínico. Todos estos tratamientos buscan degradar el producto y verificar que tan fiable sigue siendo la técnica en presencia de sustancias relacionadas o impurezas. Como criterio de aceptación se adopta que no deben observarse en el cromatograma señales que interfieran en los picos principales y por otro lado la resolución entre las impurezas y los productos de degradación debe ser tal que permita identificar el pico que corresponde al principio activo.

Con los resultados obtenidos se concluyó que las impurezas producto de la degradación no interfieren en la determinación del pico principal por lo que la técnica es **específica**.

Linealidad:

Radica en la capacidad de obtener resultados de prueba (dentro de un determinado rango) que son directamente proporcionales a la concentración de analito en la muestra.

En la validación analítica se desafía la linealidad del sistema cromatográfico entre 80% - 120% de la concentración de la solución estándar para el ensayo de valoración. Para lo cual se preparan 3 soluciones madres a partir de las cuales por dilución y combinación se obtendrán soluciones al 80 %, 90 %, 100%, 110 % y 120 %.

Tabla I

	Solución 80%	Solución 90%	Solución 100%	Solución 110%	Solución 120%
Solución madre 1	2,0 mL	--	2,0 mL	--	3,0 mL
Solución madre 2	--	--	--	2,0 mL	--
Solución madre 3	--	2,0 mL	--	--	--
Llevar a volumen final con solvente de dilución	25,0 mL	20,0 mL	20,0 mL	20,0 mL	25,0 mL
Concentración final	0,048 mg/mL	0,054 mg/mL	0,060 mg/mL	0,066 mg/mL	0,072 mg/mL

Se procede a analizar cada una de estas soluciones por duplicado. Con las áreas obtenidas se procede a realizar el cálculo de la pendiente, la ordenada al origen y los intervalos de confianza. Por último se evaluará el coeficiente de correlación (r).

Parámetros de la recta	Característica de la técnica
Pendiente	Sensibilidad del método
Ordenada al origen	Proporcionalidad del método (que la recta pase por el origen)
Coeficiente de correlación	Linealidad del método

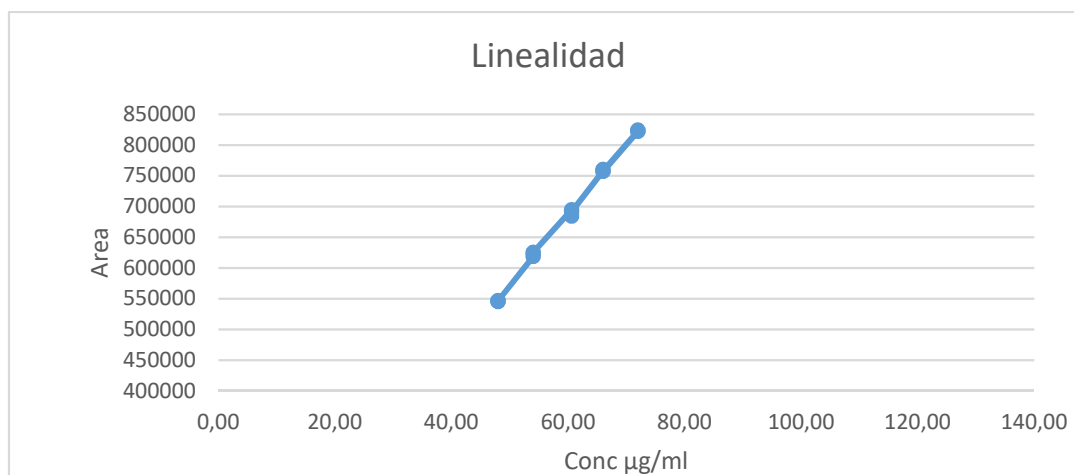
Como criterio de aceptación se establece que $R \geq 0,99$, lo que indica que el método analítico es lineal en las concentraciones indicadas en la tabla I.

Del caso analizado se obtuvieron los siguientes datos

Cálculos de Linealidad del sistema	
Número de mediciones	30
	R= 0,999



Calculo del Coeficiente de regresion lineal		
	$R^2=$	0,998
Calculo de la pendiente	$b=$	11528,7
Calculo de la ordenada al origen	$a=$	-5159,8



Dados los resultados de la validación el método analítico se considera **lineal** por poseer un $R = 0,999$ a las concentraciones de 0,048 mg/mL; 0,054 mg/mL; 0,060 mg/mL; 0,066 mg/mL y 0,072 mg/mL que corresponden al 80%, 90%, 100%, 110% y 120% de concentración de la solución de trabajo.

Precisión:

Según el VIM la precisión consiste en la proximidad entre las indicaciones o los valores obtenidos en mediciones repetidas de un mismo objeto bajo condiciones específicas. Siguiendo la misma línea para la técnica analítica, radica en la verificación de los resultados obtenidos de muestras individuales de una muestra homogénea. Esto es verificado a través de la repetibilidad del sistema, repetibilidad del método y la precisión intermedia. A continuación se desarrollarán cada una de estas componentes de la precisión para la validación de un método analítico.

- Repetibilidad del sistema y del método:

Para la repetibilidad del sistema se inyectan en el HPLC por sextuplicado una muestra de un estándar preparado a una concentración conocida (a partir solo de estándar de principio activo), a partir de dichos ensayos se determina el desvío estándar (s) y el coeficiente de variación (CV). Por otro lado para evaluar la repetibilidad del método se preparará la solución estándar por duplicado y se deberá preparar por sextuplicado una solución con la misma concentración que



el estándar pero partiendo de comprimidos, de la misma forma se determina el desvío estándar (s) y el coeficiente de variación (CV).

El criterio de aceptación para ambos ensayos es que su coeficiente de variación sea $CV \leq 2,0\%$ entre las inyecciones de los estándar y de las soluciones preparadas a partir de los comprimidos. Estos ensayos se ejecutan de manera completamente independiente, al igual que el análisis de sus resultados.

Repetibilidad del sistema:

Estándar	
Replicados	Área de Pico
1	703454
2	702432
3	702673
4	702256
5	702028
6	702902

Promedio: 702624
RSD % (n=6): 0,1%
Especificado Máximo: 2,0%
Resultado: Cumple

Repetibilidad del método:

Conc mtra µg/ml	Área de Pico	
	Iny. 1	% Encontrado
60,1	656223	94,0
60,1	670299	96,1
60,0	660014	94,8
60,1	661517	94,9
60,0	661458	95,1
60,1	662957	95,1

Mínimo	94,0
Máximo	96,1
Promedio	95,0
DRS %	0,7

Del análisis de los resultados se concluye que tanto el método como el sistema son **repetibles** ($CV \leq 2,0\%$)

- *Precisión intermedia:*

Para la precisión intermedia se procede a llevar a cabo el análisis repetidas veces en el mismo laboratorio variando los analistas, los días de análisis y los equipos para determinar la capacidad de que tiene el método de para ser reproducible.

Para dicha evaluación se deben preparar dos soluciones estándar a partir de principio activo estándar y también se deberán preparar por sextuplicado soluciones estándar a partir de los comprimidos de producto (tal como se evaluó la repetibilidad del método). A partir de los datos obtenidos se evalúan con respecto a los obtenidos en la repetibilidad del método. De igual forma que en los casos anteriores se adopta como criterio de aceptación que el $CV \leq 2,0\%$.

Resultados del ensayo de precisión intermedia:

Conc mtra µg/ml	Área de Pico	
	Iny. 1	% Encontrado
60,4	681775	97,0
60,6	668843	94,9
60,3	666031	95,0
60,2	655341	93,6
60,0	662748	94,9
60,0	661655	94,8

Mínimo	93,6
Máximo	97,0
Promedio	95,0
DRS %	1,2

Comparando con los resultados del ensayo de repetibilidad del método:

	Análisis 1	Análisis 2	Promedio	RSD	CV%
% API	95,0	95,0	95,0	0,009	0,9

El CV obtenido comparando ambos ensayos es de 0,9 % por lo que el método es **reproducible**.

Exactitud:

Se encuentra definido por el VIM como la proximidad entre un valor medido y el valor verdadero, en la validación de la técnica analítica se evalúa llevando a cabo el método analítico para determinar la concentración de un analito (principio activo) de pureza conocida que se introduce a distintas concentraciones dentro de una matriz con otros componentes, en este caso se utiliza el placebo del medicamento (todos los componentes excepto el principio activo). Los resultados se expresan como % recuperado de principio activo de la matriz.

Se prepara el placebo con todos los componentes tal cual es la fórmula del medicamento y se agrega principio activo para llegar a tres concentraciones distintas con respecto a la solución de trabajo estándar (80%, 100% y 120%). Se calcula el desvío estándar de las determinaciones de las soluciones estándar y el porcentaje de principio activo recuperado en cada nivel de concentración de las muestras preparadas.

Como criterio de aceptación se fijan que los porcentajes de recuperación individuales deben estar dentro del intervalo de $97\% \leq x \leq 103\%$, y de la misma forma el porcentaje de recuperación promedio debe estar dentro del intervalo de $98\% \leq x \leq 102\%$. Por otro lado el coeficiente de variación porcentual (CV%) del porcentaje de recuperación debe ser $\leq 2\%$.

Los resultados obtenidos en los ensayos individuales son los siguientes:

Nivel	Parámetro	Exactitud	Especificado	Evaluación
Nivel 80%	Mínimo	101,4	Min.97,0%	Cumple
	Máximo	102,1	Max. 103,0%	Cumple
	Promedio	101,8	Entre 98,0% y 102,0%	Cumple
	RSD%	0,4	Max. 2,0%	Cumple
Nivel 100%	Mínimo	100,9	Min.97,0%	Cumple
	Máximo	101,6	Max. 103,0%	Cumple
	Promedio	101,3	Entre 98,0% y 102,0%	Cumple
	RSD%	0,4	Max. 2,0%	Cumple
Nivel 120%	Mínimo	98,1	Min.97,0%	Cumple
	Máximo	100,8	Max. 103,0%	Cumple
	Promedio	99,7	Entre 98,0% y 102,0%	Cumple
	RSD%	1,4	Max. 2,0%	Cumple

El porcentaje de recuperación promedio es de 100,9% con un CV% = 1,2% por lo que la metodología analítica para la determinación del principio activo dentro de la matriz (placebo) se considera con la **exactitud adecuada**.

Robustez:

Dentro del VIM no se encuentra una definición para robustez dado que el término es más utilizado para la metodología analítica. Definido según ICH es la capacidad para que un método se

mantenga invariable por pequeños pero intencionados cambios en la metodología analítica y que la misma demuestre una fiabilidad frente al uso normal.

En la validación de la técnica analítica se modificarán las condiciones cromatográficas tales como velocidad de flujo, temperatura, pH, concentración de fase móvil y concentración de buffer. Se evaluarán los parámetros cromatográficos de tailing, tiempo de retención, platos teóricos, áreas y capacidad de resolución. En total se harán 8 ensayos de acuerdo a la variación de las condiciones cromatográficas de la siguiente tabla:

Tabla II

<u>Diseño experimental</u>								
	1	2	3	4	5	6	7	8
Flujo	+	+	+	+	-	-	-	-
Temperatura	+	+	-	-	+	+	-	-
Conc. Trietilamina	+	-	+	-	+	-	+	-
pH	+	+	-	-	-	-	+	+
Acetonitrilo : Buffer	+	-	+	-	-	+	-	+
Dummy 1	+	-	-	+	+	-	-	+
Dummy 2	+	-	-	+	-	+	+	-

<u>Diseño experimental con valores de trabajo</u>								
	1	2	3	4	5	6	7	8
Flujo (mL/min)	1,2	1,2	1,2	1,2	0,8	0,8	0,8	0,8
Temperatura (°C)	35	35	25	25	35	35	25	25
Conc. Trietilamina	1,1	0,9	1,1	0,9	1,1	0,9	1,1	0,9
pH	6,2	6,2	5,8	5,8	5,8	5,8	6,2	6,2
Acetonitrilo : Buffer	45,9/54,1	44,1/55,9	45,9/54,1	44,1/55,9	44,1/55,9	45,9/54,1	44,1/55,9	45,9/54,1
Dummy 1	+	-	-	+	+	-	-	+
Dummy 2	+	-	-	+	-	+	+	-

Como criterio de aceptación se adopta que la diferencia absoluta porcentual de la concentración de analito (principio activo) evaluado no deberá diferir en más de 2,0 % entre el análisis normal frente a la condición diferente.

Se obtuvieron los siguientes resultados:

Respuesta	Cond. Nominal	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	Exp. 4	Exp. 5	Exp. 6	Exp. 7	Exp. 8
RSD	0,04	0,01	0,05	0,02	0,11	0,02	0,01	0,03	0,02
T	1,1	1,2	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1
N	11792	10550	11522	9999	10453	15246	13733	13466	12710
R	20,9	19,4	22,6	18,8	21,1	26,1	21,9	22,8	20,5
k'	1,8	2,1	2,5	2,0	2,4	2,4	1,9	2,2	1,9
Adecuación	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
% Recuperación	92,312	92,297	92,252	92,303	92,325	92,362	92,346	92,280	92,275
%API _{nominal} - %API _{exp}	-	0,014	0,060	0,009	0,013	0,051	0,034	0,031	0,036

Variable	RSD	T	N	R	k'
Flujo (mL/min)	0,01	0,00	-1579	-9,4	0,5
Temperatura (°C)	-0,01	0,01	553	6,7	0,3
Conc. Trietilamina (mL)	-0,01	0,00	105	1,0	0,0
pH	-0,01	0,01	-148	-2,6	0,0
Acetonitrilo:Buffer	-0,02	0,02	-462	-12,1	-1,6

RSD= repetibilidad, T=tailing, N=nro de platos teóricos, R=resolución, K=capacidad



Variable	RSD	T	N	R	k'
Especificado	<i>Máximo</i> 2,0	<i>Máximo</i> 2,0	<i>Mínimo</i> 5000	<i>Mínimo</i> 1,5	<i>Mínimo</i> 1,5
Min. Observado	0,01	1,1	9999	18,8	1,9
Experimento	1	7	3	3	6
Máx. Observado	0,11	1,2	15246	26,1	2,5
Experimento	4	1	5	5	2
Rango	0,1	-0,1	-5247	-7,3	-0,6

La metodología no sufrió variaciones importantes en los parámetros evaluados (repetibilidad, tailing, número de platos teóricos, resolución y capacidad) con las modificaciones de las condiciones del método expuestas en la tabla II. Por lo que se considera que la metodología analítica es **robusta**.

Límite de detección y cuantificación:

Según ICH el límite de detección es la cantidad más baja de analito que puede ser detectada pero no necesariamente cuantificada. El VIM lo define como el valor medido con una probabilidad β de declarar erróneamente la ausencia de un constituyente de un material, dada una probabilidad α de declarar erróneamente su presencia. En ambas definiciones se expresa que un análisis que arroje como resultado este valor no es lo suficientemente confiable y mucho menos cuantificable.

Para el caso de la técnicas analíticas el límite de detección se establece como la concentración a la cual la relación señal:ruido es de 3.

El límite de cuantificación no se encuentra definido en el VIM y según ICH es la cantidad más baja de analito que puede ser cuantificada con nivel apropiado de exactitud y precisión. En la validación de las técnicas analíticas se establece como la concentración a la cual la relación señal:ruido es de 10.

Para el análisis de ambos límites se parte de una solución estándar con una concentración teórica de 0,50 $\mu\text{g/mL}$ a partir del área obtenida de dicho análisis se estiman y ensayan los límites de detección y cuantificación.

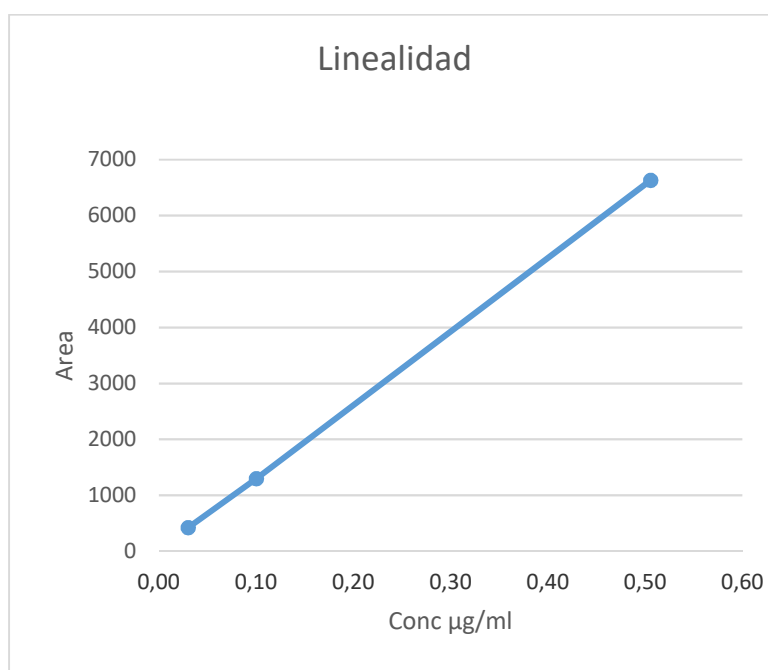
Como criterio de aceptación la solución ensayada además de cumplir con la relación señal:ruido 3 y 10 para límite de detección y cuantificación respectivamente, deberán arrojar resultados lineales.

	Resultados		
	Concentración	Áreas	S/R
	0,51	6632	60,74
LOC	0,1	1298	11,4
LOD	0,03	422	3,7



Cálculos de Linealidad del sistema	
Calculo del Coeficiente de regresion lineal	R= 1,000
	R ² = 1,000
Calculo de la pendiente	b= 13095,4
Calculo de la ordenada al origen	a= 9,5

Cálculos del Intercepto Cero	
DS de la ordenada al origen	24,2
Intercepto Cero Relativo (%)	0,7



NOTA: los valores de límite de detección y cuantificación no se corresponden con los del ensayo de linealidad dado que ambos límites son ensayados solo para la pureza cromatográfica y no para la valoración, ya que en una valoración de producto sería extraño encontrar valores cercanos al límite de detección o cuantificación.

D. Conclusión y reflexión final:

En el presente trabajo se expusieron los resultados de la validación del método de valoración de Tenofovir (Especificidad, Linealidad, Precisión, Exactitud, Robustez) y de la pureza cromatográfica (Límite de detección y Cuantificación) indicando que el proceso de validación es satisfactorio ya que se cumplieron todos los criterios de aceptación postulados para cada parámetro.

Dada la gran cantidad de activos, técnicas analíticas y constantes modificaciones resulta fundamental que los laboratorios farmacéuticos tengan siempre las técnicas de análisis validadas y actualizadas en línea con las normativas sanitarias vigentes. Esta actualización y validación constante hace no solo a la mejora y veracidad de los análisis ejecutados, sino que obliga a que los procesos de elaboración de medicamentos estén siempre con una exigencia cada vez más alta de calidad, ya que no solo las técnicas analíticas son validadas constantemente también lo son los productos. Estas constantes validaciones generan círculos de Deming uno tras otro, que no es otra cosa que mejora continua. Algunas industrias trabajan en mejora continua para bajar sus costos, eficientizar sus procesos, bajar el nivel de reclamos y quejas, a fin de cuentas mejorar la calidad de sus productos, pero la industria farmacéutica al ser una industria tan crítica las regulaciones locales e internacionales la exigen a este proceso de mejora continua. Suena este proceso beneficioso ya que quien no adopta la mejora continua como filosofía se queda en el camino, pero eso también lleva a que a nivel global sean poco más de 15 las farmacéuticas que controlan el mercado, por lo que queda aún mucho trabajo por hacer en las farmacéuticas más pequeñas que brindan medicamentos a precios accesibles a toda la población.

E. Bibliografía y material consultado:

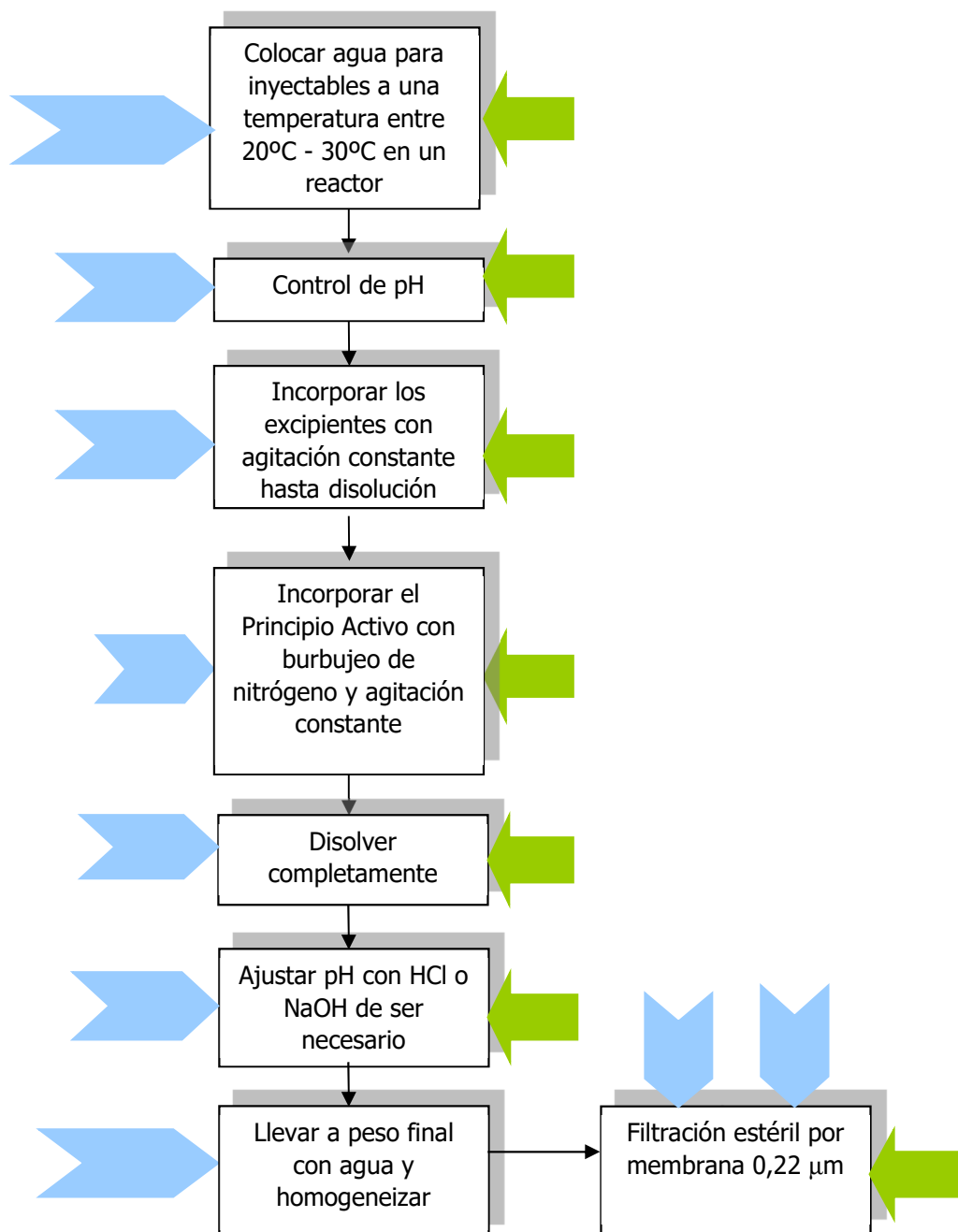
- ICH: Q2 (R1) Validation of analytical procedures.
- VIM (Vocabulario internacional de metrología)
- USP (United States Pharmacopeia)
- Protocolos e Informes de validación de técnicas analíticas (documentación de la compañía)
- Plan Maestro de Validación (documentación de la compañía)

Anexos

Diagramas de Flujo

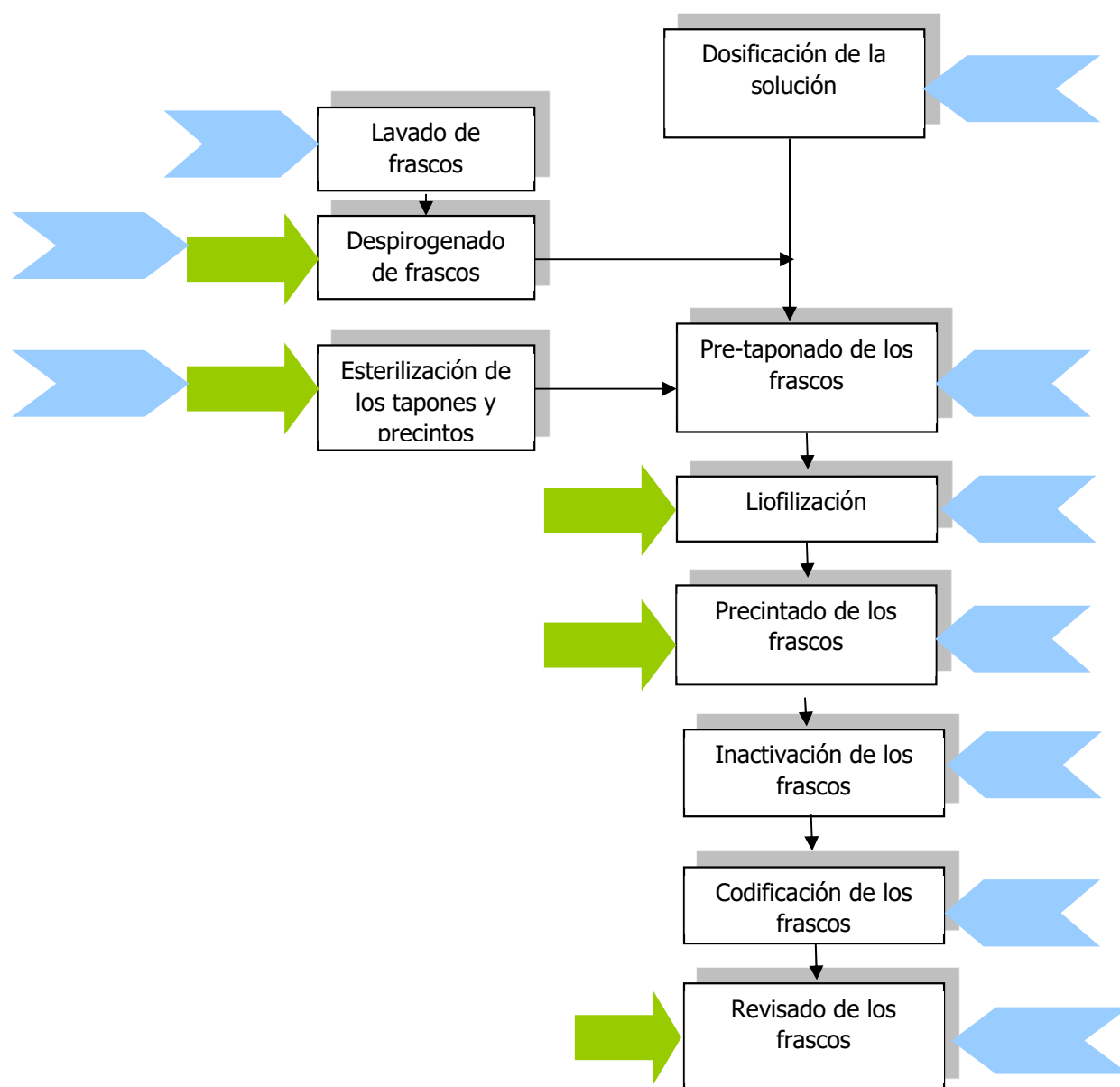
Las plantas de elaboración de inyectables siguen el siguiente de diagrama de flujo (las flechas verdes corresponden a puntos críticos de control y las celestes corresponden a los puntos de control):

- *Elaboración del inyectable:*



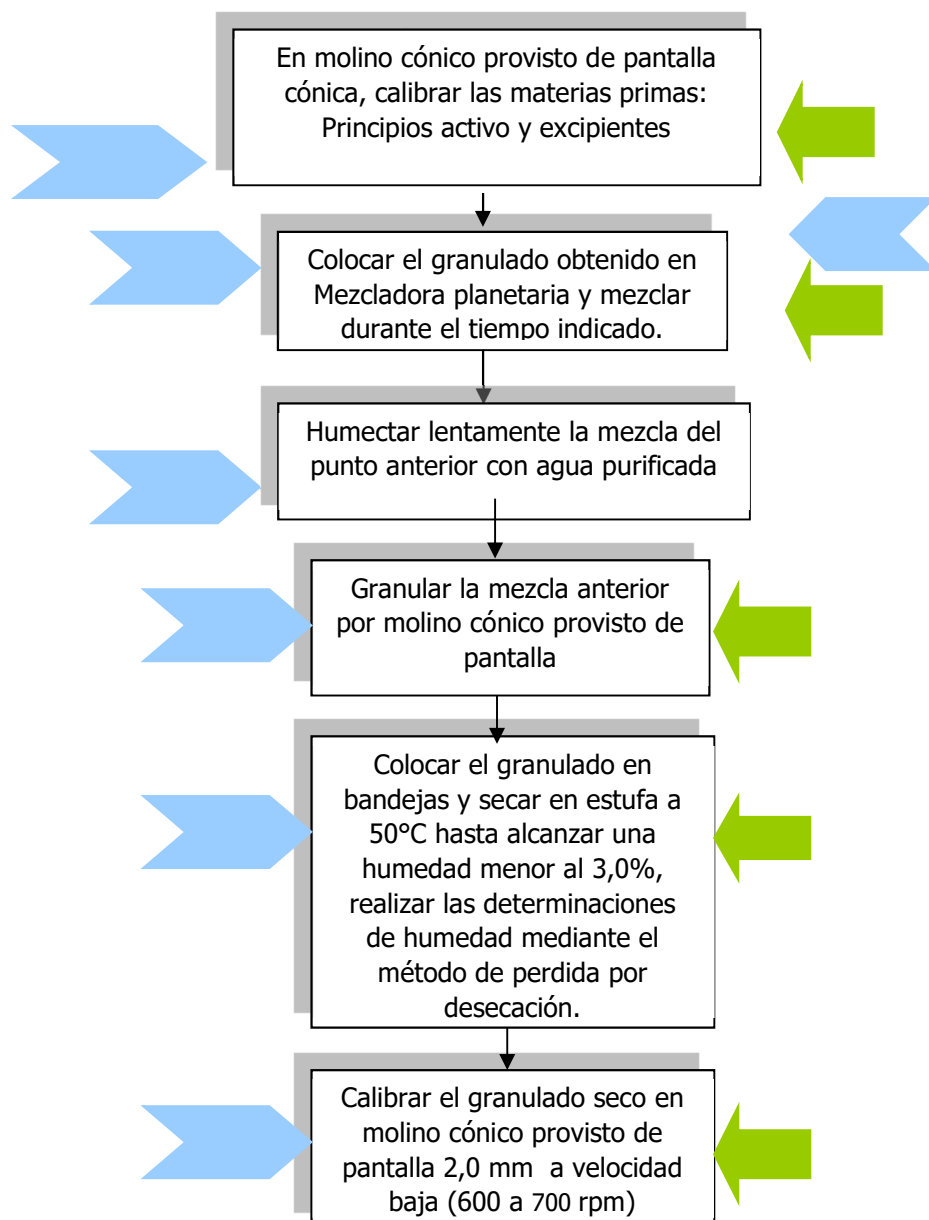


- Dosificado del inyectable:

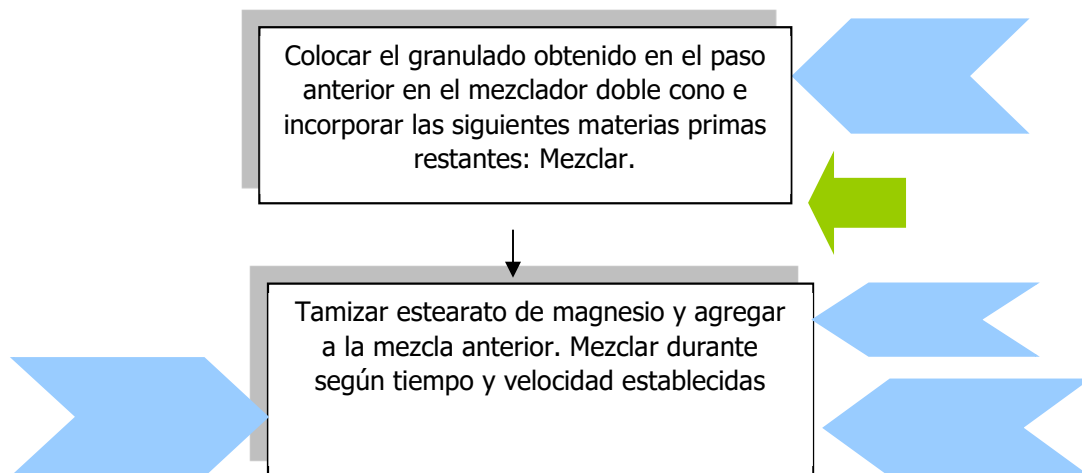


Las plantas de elaboración de comprimidos siguen el siguiente diagrama de flujo (las flechas verdes corresponden a puntos críticos de control y las celestes corresponden a los puntos de control). Principalmente el proceso de elaboración de comprimidos se divide en granulación, mezclado, compresión y recubrimiento:

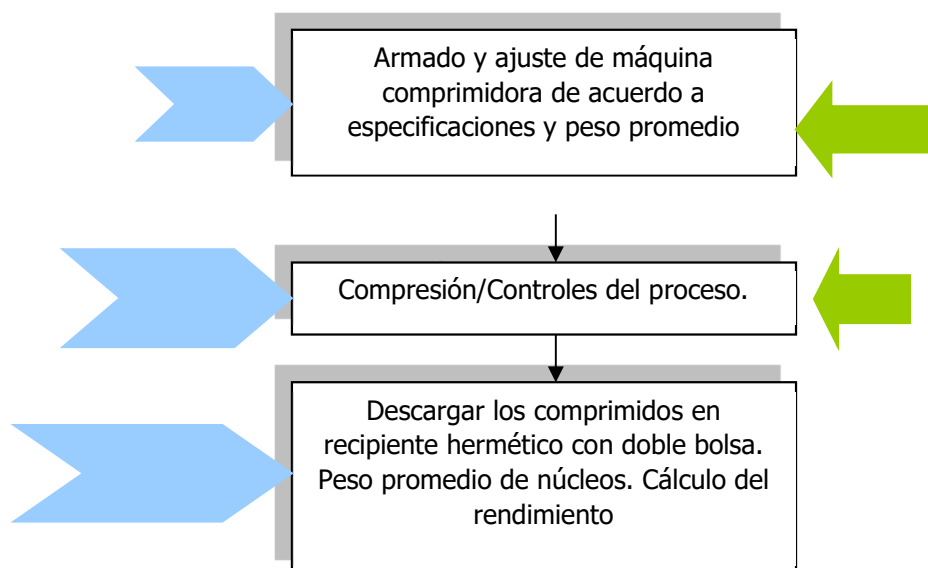
- Diagrama de flujo del proceso granulado



- Diagrama de flujo del proceso mezclado



- Diagrama de flujo del proceso de compresión



- Diagrama de flujo del proceso de recubrimiento

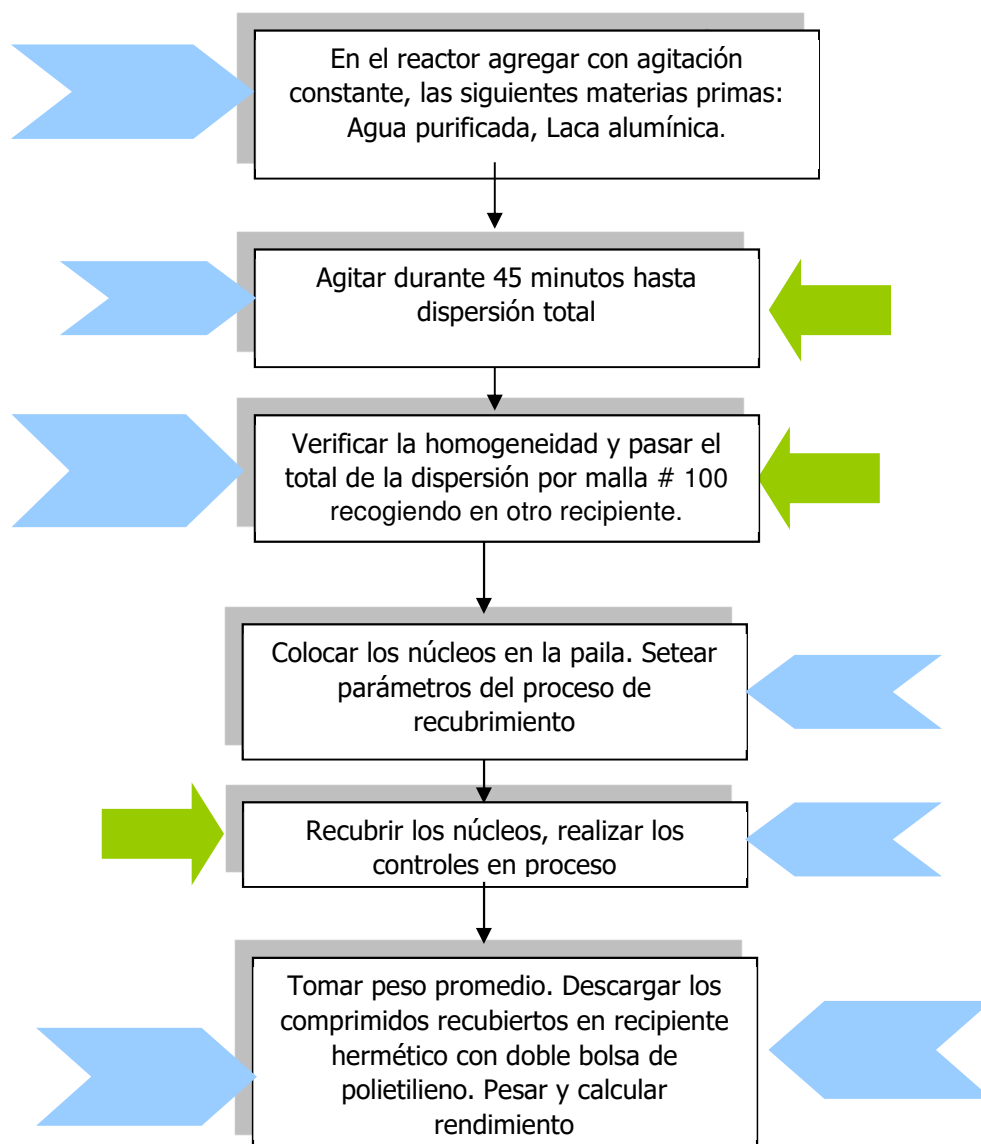


Diagrama de Ishikawa: factores influyentes en la incertidumbre de la metodología analítica de valoración de un fármaco.

