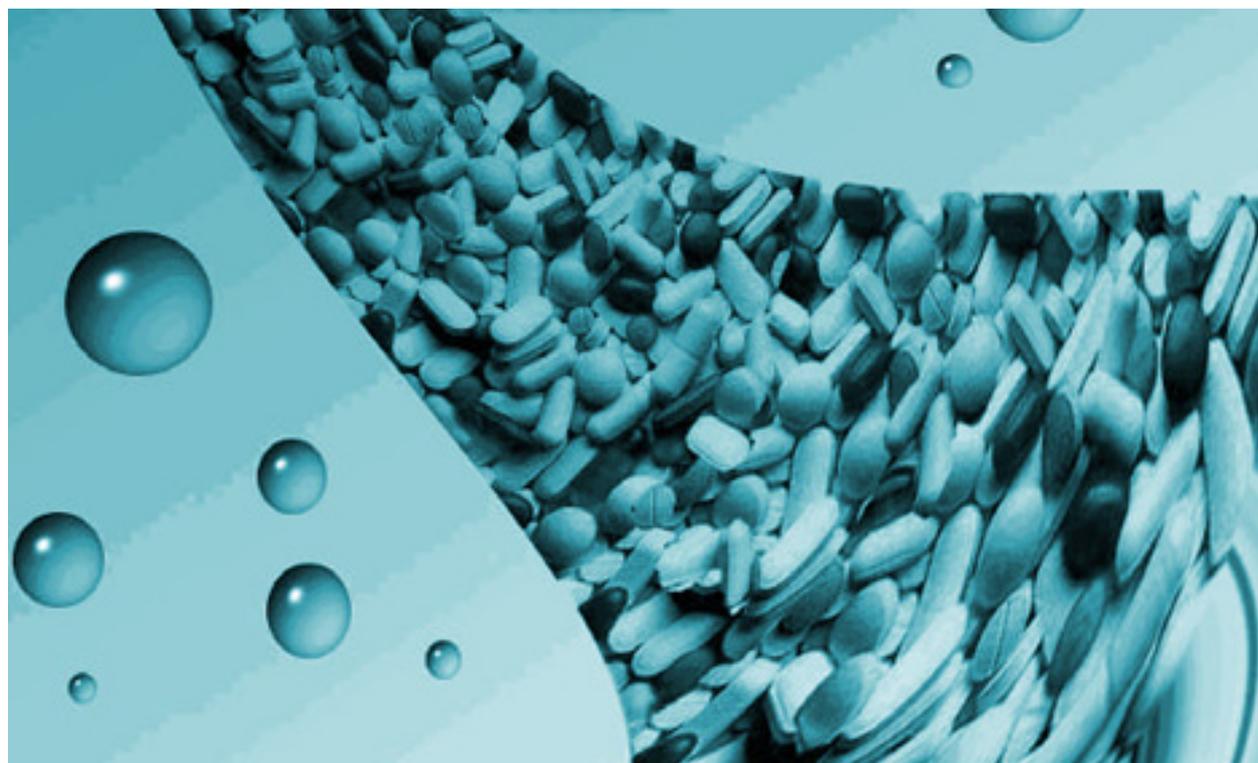


DESARROLLO DE NUEVAS METODOLOGÍAS ANALÍTICAS EN EL CONTROL DE CALIDAD DE LA INDUSTRIA FARMACÉUTICA



Miquel Àngel Romero Gamero

Grup de Quimiometria Aplicada
Unitat de Química Analítica
Departament de Química



Edifici C
08193 Bellaterra (Barcelona) Spain
Tel: (3) 581 17 12
Fax: (3) 581 23 79
E-mail: gr.quimiometria@uab.es

Dr. Marcelo Blanco Romia, Catedrático de Química Analítica de la facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Barcelona,

CERTIFICA: Que el presente trabajo de investigación titulado: “**Desarrollo de nuevas metodologías analíticas en el control de calidad de la industria farmacéutica**”, que constituye la Memoria presentada por Miquel Àngel Romero Gamero para aspirar al grado de doctor en Ciencias Químicas, ha sido realizado bajo mi dirección y reuniendo, según mi parecer, las condiciones exigidas para este tipo de trabajo.

Y para que quede constancia, firma el presente certificado en Bellaterra a 3 de Diciembre de 2001.

Dr. Marcelo Blanco

OBJETIVOS

INTRODUCCIÓN

1. Control de Calidad en la Industria Farmacéutica

1.1. Calidad y Control de Calidad

1.2. Evolución Histórica de la Normativa Farmacéutica

1.3. Controles de Rutina Farmacéuticos

1.3.1. Tests Habituales en Control de Calidad

1.3.1.1. Aspecto

1.3.1.2. Identificación

1.3.1.3. Ensayo de contenido

1.3.1.4. Sustancias relacionadas

1.3.1.5. Propiedades fisicoquímicas

1.3.1.6. Test de disolución

1.3.1.7. Test de uniformidad de contenido

1.3.1.8. Ensayos biológicos

1.3.2. Métodos instrumentales

1.4. Validación de Métodos de Análisis

1.4.1. Parámetros de Calidad

1.4.1.1. Selectividad

1.4.1.2. Linealidad

- 1.4.1.3. Intervalo
- 1.4.1.4. Exactitud
- 1.4.1.5. Precisión
- 1.4.1.6. Límite de Detección
- 1.4.1.7. Límite de Cuantificación
- 1.4.1.8. Robustez

2. Electroforesis Capilar

- 2.1. Introducción
- 2.2. Fundamentos teóricos
- 2.3. Aspectos instrumentales
 - 2.3.1. Esquema de un instrumento de CE
 - 2.3.2. Inyección
 - 2.3.2.1. Inyección hidrodinámica
 - 2.3.2.2. Inyección electrocinética
 - 2.3.2.3. Concentración de muestra en el capilar
 - 2.3.3. Capilares
 - 2.3.4. Termostatación
 - 2.3.5. Fuente de voltaje
 - 2.3.6. Detección
 - 2.3.6.1. Detección UV-visible
- 2.4. Modos de Aplicación en CE
 - 2.4.1. Electroforesis capilar de zona (CZE)
 - 2.4.2. Cromatografía electrocinética micelar (MEKC)

3. Espectroscopia en el Infrarrojo Cercano

- 3.1. Introducción
- 3.2. Fundamentos de la técnica
 - 3.2.1. Origen de la absorción
 - 3.2.2. Oscilador armónico-anarmónico
 - 3.2.3. Absorción de las bandas en el infrarrojo cercano
 - 3.2.4. Interacción de la radiación NIR con la muestra
 - 3.2.4.1. Medidas por transmisión
 - 3.2.4.2. Medidas por reflectancia
- 3.3. Instrumentación
 - 3.3.1. Fuente de radiación

3.3.2. Sistemas de selección de longitudes de onda

3.3.3. Compartimiento de muestra

3.3.4. Detector

3.4. Aplicaciones NIR en la industria farmacéutica

4. Quimiometría en espectroscopia NIR

4.1. Introducción

4.2. Etapas del proceso de modelado

4.2.1. Selección del conjunto de calibración

4.2.2. Métodos de referencia

4.2.3. Obtención de la señal analítica

4.2.4. Cálculo del modelo

4.2.5. Validación del modelo

4.2.6. Aplicación del modelo

4.2.7. Análisis de rutina y monitorización

4.2.8. Transferencia del modelo

4.3. Pretratamientos espectrales

4.3.1. Promediado de espectros

4.3.2. Suavizado espectral

4.3.3. Corrección de línea base

4.3.4. Derivación

4.3.5. Corrección del efecto multiplicativo de la dispersión

4.3.6. Variable normal estándar

4.4. Reducción de variables-PCA

4.4.1. Tratamiento previo de los datos

4.4.2. Análisis en componentes principales

4.5. Técnicas quimiométricas en análisis cualitativo

4.5.1. Métodos de reconocimiento de pautas

4.5.1.1. Métodos no supervisados

4.5.1.2. Métodos supervisados

4.5.2. Bibliotecas de identificación-clasificación de espectros

4.6. Técnicas quimiométricas en análisis cuantitativo

4.6.1. Regresión lineal múltiple

4.6.1.1. Regresión lineal múltiple clásica

4.6.1.2. Regresión lineal múltiple inversa

- 4.6.2. Métodos basados en reducción de variables
 - 4.6.2.1. Regresión en componentes principales
 - 4.6.2.2. Regresión parcial por mínimos cuadrados
 - 4.6.2.3. Evaluación de la capacidad predictiva del modelo
 - 4.6.2.4. Elección del número de componentes principales
- 4.7. Corrección ortogonal de la señal

METODOLOGÍA Y DISCUSIÓN GLOBAL DE LOS RESULTADOS

1. Introducción

2. Metodología

- 2.1. Metodología instrumental
- 2.2. Metodología experimental
 - 2.2.1. Metodología experimental CE
 - 2.2.2. Metodología experimental NIR
- 2.3. Metodología del tratamiento de datos
 - 2.3.1. Tratamiento de datos de CE
 - 2.3.2. Tratamiento de datos NIR

3. Discusión de resultados

- 3.1. Métodos de análisis por electroforesis capilar
 - 3.1.1. Análisis de Evacuol por CZE
 - 3.1.2. Separación de los Sorbitolparabenos
- 3.2. Métodos de análisis por espectroscopia en el infrarrojo cercano
 - 3.2.1. Bibliotecas NIR para la identificación de materias primas
 - 3.2.2. Estrategias de calibración NIR
 - 3.2.3. Determinación NIR del principio activo de un hidrogel

CONCLUSIONES

SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

ANEXOS

- Anexo I:** Analytical control of a pharmaceutical formulation of sodium picosulfate by capillary zone electrophoresis.

- Anexo II:** Resolution of isomers of sorbitolparaben esters by chromatographic and electrophoretic techniques.
- Anexo III:** NIR libraries in the pharmaceutical industry. A solution for identity confirmation.
- Anexo IV:** Strategies for constructing the calibration set for a near infrared spectroscopic quantitation method.
- Anexo V:** Orthogonal signal correction in near infrared calibration.
- Anexo VI:** Near infrared transfectance spectroscopy. Determination of dexketoprofen in a hydrogel.

OBJETIVOS

Las crecientes exigencias de calidad los productos farmacéuticos y la necesidad de optimización del proceso productivo hacen que sea necesario disponer de métodos de análisis rápidos y fiables. Algunos de los métodos de análisis aún vigentes conllevan una complejidad de tratamiento de muestra y un elevado tiempo de análisis, que afectan la productividad.

El objetivo propuesto en esta tesis es el desarrollo de metodologías instrumentales de análisis aplicables a distintas necesidades que existen en el control de calidad de la industria farmacéutica. Para llevar a cabo este objetivo se han utilizado dos técnicas instrumentales de reciente aparición: la electroforesis capilar y la espectroscopia en el infrarrojo cercano.

La elección de técnicas de tan distintas características, la primera es una técnica de separación mientras que la segunda es una técnica espectroscópica, no es casual si se tiene en cuenta la gran diversidad y distinta naturaleza de las pruebas de análisis a realizar en el control de calidad farmacéutico. Con estas técnicas instrumentales se abordarán algunas de estas necesidades de análisis, poniendo especial atención a la metódica de trabajo a seguir según la técnica y la finalidad del método.

La electroforesis capilar se aplica con el objeto de desarrollar y validar un método para la separación y determinación de todos los componentes de un preparado farmacéutico, que permita su aplicación tanto en el análisis de los componentes del fármaco como en el control de estabilidad del mismo.

-Las nuevas metodologías se comparan con las usuales basadas en HPLC con el objeto de establecer ventajas e inconvenientes para realizar la selección más adecuada a cada caso.

Se estudia la aplicabilidad de la espectroscopia NIR tanto para la identificación como la determinación de productos farmacéuticos. Este estudio se desarrollará en dos vertientes distintas:

-Diseño, construcción y validación de bibliotecas de espectros NIR para la identificación de productos de la industria farmacéutica.

-Desarrollo y validación de métodos para la determinación de principios activos en preparados farmacéuticos.

1

CONTROL DE CALIDAD EN LA INDUSTRIA FARMACÉUTICA

1.1. CALIDAD Y CONTROL DE CALIDAD

La fuerte competitividad industrial de la que somos testigos actualmente ha revolucionado el concepto de calidad, aumentando la importancia que ésta ya había tenido tradicionalmente. Hoy en día, la calidad se utiliza como sello de garantía de cualquier producto industrial. El cliente actual busca que el producto que se dispone a comprar cumpla con una serie de especificaciones y que haya sido producido bajo controles que aseguren su calidad. Es habitual oír hablar de calidad en todos los campos industriales, pero, ¿qué se entiende por “calidad”?

ISO define calidad como: “la totalidad de rasgos y características de un producto, proceso o servicio que inciden en su capacidad de satisfacer necesidades reguladas o implícitas”¹. Según esta definición, cuando se utiliza la expresión “de buena calidad” se pretende remarcar la excelencia de un producto o servicio y el cumplimiento de las especificaciones, cualitativas o cuantitativas, acordadas previamente con el cliente y/o definidas por la autoridad competente.

Debido a la importancia que ha cobrado la calidad en los sectores industrial y de servicios, se han desarrollado una serie de herramientas para tratar lo relacionado con la calidad. La Gestión de Calidad, entendida como el conjunto de actividades dirigidas a fijar objetivos y responsabilidades, y asegurar que éstos se cumplan mediante un plan estratégico, se ha convertido de esta forma en una parte muy importante de la gestión general de cualquier organización. La aparición de numerosos estándares de calidad (normas ISO, EFQM...), normas de obligado cumplimiento bien por normativa o bien por imposiciones del mercado, hacen necesario que toda empresa que deba estar “certificada” de acuerdo a normativas de calidad, deba disponer de un Departamento de Calidad. Dicho departamento es el responsable de hacer cumplir la Política de Calidad de la empresa, llevando a cabo todas las acciones o bien delegando en otros departamentos parte de sus responsabilidades.

Un elemento muy importante en la Gestión de Calidad de la empresa es el Control de Calidad ya que es la herramienta que permite asegurar que los productos fabricados cumplen una serie de requisitos que los definen como “de calidad”. Puede ser definido como: “Combinación de sistemas, procedimientos, instrucciones y actividades realizadas para controlar y mantener un trabajo de calidad”. A la práctica, el Control de Calidad consiste en realizar mediciones de parámetros del producto, determinando si los valores obtenidos están en concordancia con unas especificaciones preestablecidas. Generalmente, dicho control de calidad es aplicado a los productos producidos y utilizados por una empresa, ya se trate de productos finales, intermedios o materias primas.

Si la calidad es un parámetro importante en todos los sectores industriales, ésta es aún de más relevancia en la industria farmacéutica. Por la finalidad y naturaleza de los productos farmacéuticos, la exigencia de calidad en éstos es mayor, debido a los posibles efectos perjudiciales para la salud. La calidad de un producto farmacéutico puede atribuirse al cumplimiento de dos condiciones básicas:

- Que el producto farmacéutico en cuestión sea efectivo en el tratamiento de una determinada patología.
- Que no provoque efectos perjudiciales o no deseados, es decir que sea seguro para la salud.

Una mayor exigencia de calidad se traduce en controles de calidad más estrictos y el cumplimiento de normativas específicas, como buenas prácticas de fabricación (GMPs, *Good Manufacturing Practices*) y buenas prácticas de laboratorio (GPLs, *Good Laboratory Practices*). Los fabricantes europeos de medicamentos deben cumplir las Normas para la Correcta Fabricación de Medicamentos de Uso Humano y Medicamentos Veterinarios de la Unión Europea ^{2,3}. Esta normativa establece, de forma explícita la obligación de llevar a cabo un Control de Calidad. Para ello dispone que es necesario un departamento de control de calidad, separado del resto de departamentos de la empresa, que lleve a cabo los análisis y pruebas necesarias en relación a los materiales de partida, así como controles adecuados de productos intermedios y acabados.

A continuación se comentará la evolución de las normativas referentes a productos farmacéuticos a lo largo del siglo XX, intentando aportar una visión general de cómo fueron creándose las leyes reguladoras de los medicamentos así como de las distintas organizaciones que regulan la producción y comercialización de los productos farmacéuticos.

1.2. EVOLUCIÓN HISTÓRICA DE LA NORMATIVA FARMACÉUTICA

A lo largo del siglo XX una serie de sucesos han propiciado la aparición de organismos reguladores para controlar la calidad de los productos farmacéuticos, con la finalidad de asegurar que éstos cumplan con una serie de requisitos de calidad y seguridad. A principios de siglo, la escasa y dispersa normativa sobre control de calidad y de seguridad de los medicamentos, no imponía condiciones estrictas a las industrias farmacéuticas en la fabricación y comercialización de sus productos. En EEUU, la Federal Pure Food and Drug Act de 1906 legislaba sobre el transporte interestatal de alimentos y medicamentos adulterados. Esta ley no obligaba a las compañías farmacéuticas a establecer ni la eficacia ni la seguridad de los medicamentos que comercializaban.

En 1938 más de 100 niños murieron en EEUU como consecuencia de la comercialización de una solución de sulfanilamida en dietilenglicol, el cual era un excelente solvente, pero a la vez muy tóxico. Este desgraciado hecho dio origen ese mismo año a la enmienda del acta federal de 1906, a partir de la cual se incluyó el concepto de seguridad de los medicamentos, siendo la Food and Drug Administration (FDA) la encargada de su aplicación práctica. A partir de ese momento, se comenzaron a exigir estudios de toxicidad de los fármacos existentes, a la vez que se exigía que una solicitud de nuevo fármaco (New Drug Application, NDA) debía ser aprobada por la FDA para que éste pudiera ser promocionado y distribuido. Sin embargo aún no se exigían pruebas de la eficacia de un medicamento para concederle permiso de comercialización y, además, un medicamento pasaba de la etapa de investigación animal a la investigación clínica sin la aprobación de la FDA.

En la década de los 60, el desastre de la talidomida, medicamento promovido para ser usado en el primer trimestre del embarazo y que demostró ser altamente teratogénico, dio la vuelta al mundo, marcando un punto de inflexión en lo referente a normativa farmacéutica. Esta catástrofe introduce un cambio fundamental y permite que se introduzcan, en todos los países desarrollados, una serie de leyes que exigen seguridad y eficacia demostrada con ensayos clínicos controlados. En los EEUU la respuesta fue una enmienda al acta de Alimentos, Medicamentos y Cosméticos en 1962 que requiere que se presente suficiente investigación farmacológica y toxicológica en animales antes que un nuevo fármaco pueda ser probado en humanos. En Europa, todos los países adaptarán su legislación: Noruega y Suecia (1964), Inglaterra (1968), Suiza (1971) y Alemania (1976). Las nuevas leyes exigen a los productos farmacéuticos pruebas de la eficacia y documentación que demuestre la seguridad relativa del nuevo medicamento, en términos de la relación riesgo / beneficio.

Los nuevos requisitos de estas leyes determinaron que el tiempo total de desarrollo de un nuevo medicamento se extendiera de 8 a 9 años. En los últimos años los organismos reguladores de los medicamentos se han visto envueltos en un debate con grupos de consumidores y las compañías farmacéuticas en relación a la demora en la aprobación de aquellos fármacos para enfermedades con riesgo vital (como el SIDA, la Esclerosis Múltiple, etc.). Estos organismos se encuentran ante la difícil tarea de balancear, por una lado, su misión de garantizar la seguridad y eficacia de los nuevos medicamentos y, por el otro, la necesidad de la sociedad de disponer de los medicamentos útiles en un tiempo razonable.

En Europa, la situación a lo largo de la primera mitad siglo ha sido de una total descentralización de los organismos reguladores farmacéuticos. Cada estado, por medio de sus respectivos ministerios de Sanidad, regulaba la producción y comercialización de los medicamentos en su territorio, así como los controles de seguridad y eficacia que debían cumplir. Desde 1965 la Comunidad Económica Europea ha desarrollado una intensa actividad de armonización, desarrollando directivas y recomendaciones referentes a los medicamentos con medidas en defensa del interés de pacientes y consumidores. Desde la constitución de la Unión Europea (UE) en 1995, los organismos normativos del medicamento de los estados miembros se han agrupado en la European Agency for the Evaluation of Medicinal Drugs (EMA). Los gobiernos Europeos y la industria farmacéutica coincidieron en un punto de común interés: "Poner en el mercado medicamentos seguros y efectivos, dándose prioridad a la seguridad, en el menor tiempo posible para el beneficio de los pacientes". La EMA dispone el marco normativo que atañe a los productos farmacéuticos para todos los estados que conforman la Unión Europea.

En España, el organismo encargado de regular todo lo relacionado con los productos farmacéuticos es la Agencia Española del Medicamento. Esta organización, creada en 1997, unifica por primera vez las actividades de evaluación, autorización, registro y control de los medicamentos de uso humano y veterinario en España. La Agencia Española del Medicamento, es un Organismo Autónomo, adscrito al Ministerio de Sanidad y Consumo, cuyo objetivo esencial es garantizar que los medicamentos autorizados y registrados en España responden a estrictos criterios de calidad, seguridad y eficacia, según lo establecido en la normativa sobre medicamentos de la Unión Europea y en las normativas españolas.

1.3. CONTROLES DE RUTINA FARMACÉUTICOS

En este apartado se describen algunos de los tests más habituales que se realizan durante el control de calidad de los productos utilizados y producidos en una empresa farmacéutica. Además se comentarán algunos de los métodos instrumentales más utilizados para dichos tests, así como las tendencias y perspectivas actuales en métodos de análisis.

1.3.1. Tests habituales en control de calidad

Las analíticas que se realizan en un Departamento de Control de Calidad son numerosas y variadas, debido al gran número de productos distintos que se analizan y a las exigencias de cada producto. Algunas pruebas son específicas para algunos productos mientras que otros tests son más generales y se realizan para casi todos los productos. Algunos de los tests más generales se comentan a continuación.

1.3.1.1. Aspecto

Se trata de realizar una descripción cualitativa sobre el producto, tanto si es materia prima como producto acabado o intermedio. Se comprueban distintas características del producto como pueden ser: apariencia (sólido, líquido, suspensión...), color, forma, tamaño, etc. Suele realizarse mediante simple inspección visual del producto.

1.3.1.2. Identificación

Los tests de identificación deben establecer la identidad del producto analizado y ser capaces de discriminar entre compuestos parecidos o de estructura relacionada que pueden formar parte de la muestra. Este test debe ser lo más específico posible. La falta de especificidad de un método de identificación puede ser solucionada mediante combinación de varios métodos.

1.3.1.3. Ensayo de contenido

Consiste en una determinación cuantitativa del producto, para establecer su grado de pureza o bien para determinar el contenido de uno o más componentes de la muestra. Una vez realizada la determinación se comprueba si los valores obtenidos se corresponden con las especificaciones del producto.

1.3.1.4. Sustancias relacionadas

Bajo este nombre se recogen tanto las posibles impurezas que pueda contener una muestra, que pueden ser orgánicas e inorgánicas, tanto derivadas de la degradación de

alguno de los componentes de la muestra como del proceso de producción, como es el caso de los disolventes residuales. Se debe disponer de métodos adecuados que permitan determinar los bajos niveles de concentración de este tipo de sustancias en los productos farmacéuticos, para demostrar que éstos se encuentran por debajo de los valores establecidos como límites aceptables.

1.3.1.5. Propiedades fisicoquímicas

Es muy común llevar a cabo la determinación de algunas propiedades fisicoquímicas en los productos farmacéuticos. Las propiedades a determinar varían en función de la naturaleza del producto. De esta forma en preparados líquidos, como bebibles o inyectables, se suelen realizar controles de pH o de acidez, mientras que para productos sólidos se realizan ensayos de tamaño de partícula (granulometrías), control de dureza, etc.

1.3.1.6. Test de disolución

Es una medida que indica cómo el principio activo es liberado del producto farmacéutico. Es una prueba muy importante en control de calidad de preparados sólidos, ya que da una aproximación del comportamiento del medicamento en el cuerpo una vez consumido. Se suele realizar para comprimidos, sobres, supositorios e incluso para parches cutáneos.

1.3.1.7. Test de uniformidad de contenido

Es una medida de la homogeneidad del producto. También se la puede denominar homogeneidad de lote, puesto que se comprueba que distintas partes de un mismo lote (de distintas zonas de mezclador, de distintos llenados, distintas dosis individuales en el caso de comprimidos...) contengan la misma dosis de principio activo.

1.3.1.8. Ensayos biológicos

Este tipo de ensayos se realizan utilizando organismos microbiológicos para evaluar determinadas propiedades del fármaco. Se suelen realizar para muestras líquidas de las cuales debe evaluarse su esterilidad o su carga microbiológica, o bien para antibióticos y vacunas para determinar su efectividad, denominada potencia. Son muy diversos y en general suelen ser específicos para cada tipo de producto analizado.

1.3.2. Métodos instrumentales

La mayoría de los controles de rutina descritos en el punto anterior suelen llevarse a cabo mediante métodos instrumentales de análisis. La tendencia actual de las farmacopeas es a introducir cada vez más este tipo de métodos en sustitución de los métodos tradicionales de análisis, que resultan en general más laboriosos y menos objetivos. Los avances tecnológicos han permitido disponer de equipos cada vez más fiables que permiten obtener resultados de forma más rápida, sencilla y que permiten, debido a la automatización, ser utilizados por personas sin un alto grado de formación científica, lo que influye positivamente en la economía de la empresa. Por todo esto, es habitual que un departamento de Control de Calidad disponga de un número considerable de técnicas instrumentales de análisis para control de rutina. En la tabla 1.1 se muestran algunos de los equipos habituales junto con sus aplicaciones en control de calidad farmacéutico.

Tabla 1.1. Instrumentos habituales en control de calidad en la industria farmacéutica.

Instrumento	Aplicaciones
HPLC	<ul style="list-style-type: none">• Ensayos de contenido.• Caracterización de impurezas (acoplamiento con espectroscopia de masas).• Determinación de impurezas.• Ensayos de estabilidad.
Cromatografía de Gases	<ul style="list-style-type: none">• Ensayos de contenido.• Caracterización de impurezas (acoplamiento con espectroscopia de masas).• Determinación de impurezas.• Determinación de disolventes residuales (módulo de Head Space).
Espectrofotómetro de UV-VIS	<ul style="list-style-type: none">• Ensayos de contenido.• Tests de disolución.
Espectrofotómetro de Infrarrojo	<ul style="list-style-type: none">• Tests de identificación de materias primas.
Espectrofotómetros de absorción / emisión atómica de llama	<ul style="list-style-type: none">• Ensayos de contenido de metales (Na, Li, K).• Determinación de impurezas metálicas (Al, Fe...).
Polarímetro	<ul style="list-style-type: none">• Determinación de pureza óptica.• Determinación de excesos enantioméricos.

Últimamente están surgiendo nuevas técnicas instrumentales que intentan resolver los problemas o limitaciones que poseen las técnicas habituales citadas en la tabla. De este modo, es muy común la hibridación de técnicas: conjunción de técnicas de separación con técnicas espectroscópicas, para aunar las características de ambos, así como otras técnicas como electroforesis capilar, técnicas calorimétricas y nuevas técnicas espectroscópicas, que permiten realizar análisis más rápidos y con menos consumo de reactivos, obteniendo gran cantidad de información. Estas nuevas técnicas están ganando aceptación en la industria farmacéutica e introduciéndose cada vez más en los Departamentos de Control de Calidad.

En esta memoria se aborda precisamente la introducción de dos nuevas técnicas a la resolución de problemas de análisis que se presentan en la industria farmacéutica: la electroforesis capilar y la espectroscopia en el infrarrojo cercano, ambas técnicas con un gran potencial analítico y con una gran versatilidad en su posible aplicación a control de calidad farmacéutico.

1.4. VALIDACIÓN DE MÉTODOS DE ANÁLISIS

Los métodos de análisis utilizados en el control de calidad de productos farmacéuticos, que no se traten de métodos oficiales de análisis (registrados o contemplados en farmacopea), deben haber sido validados previamente a su uso en rutina. La validación de un método de ensayo tiene como finalidad demostrar la idoneidad de dicho método para llevar a cabo un análisis determinado. Mediante la validación del método se establece si los parámetros de calidad satisfacen los requisitos de una aplicación analítica concreta. Para ello, se requiere experimentación y comparación con valores de referencia bien conocidos. Los objetivos de una validación analítica son:

- Garantizar la coherencia entre los resultados obtenidos y las necesidades.
- Asegurar la calidad y constancia de la calidad de la información obtenida.
- Caracterizar métodos y herramientas analíticas.
- Facilitar las auditorías de calidad
- Fundamentar la transferencia (de métodos y herramientas) y la armonización de los resultados entre los laboratorios, con el objetivo de conseguir el reconocimiento mutuo entre laboratorios.

Uno de los requisitos básicos para llegar al cumplimiento de estos objetivos es que el laboratorio donde se realicen los ensayos trabaje bajo Buenas Prácticas de Laboratorio (GLP), que garanticen la seguridad de los resultados obtenidos. Estas normas enfatizan la

importancia de una buena organización, personal cualificado, instalaciones apropiadas, equipos y aparatos adecuados en buen estado y cualificados, métodos escritos, actualizados y disponibles, y un registro adecuado de los resultados y una posterior supervisión y verificación de los mismos.

Según la metódica de análisis que se realice, las validaciones pueden ser:

- Prospectivas: para metódicas nuevas.
- Retrospectivas: para metódicas muy utilizadas que no han sido validadas, y de las cuales se posee suficiente información para que sean validadas.
- Revalidaciones: para metódicas validadas en las cuales se han introducido cambios. El grado de revalidación dependerá de la naturaleza e importancia de los cambios.

Existen numerosos textos oficiales que sirven de guía para la validación de métodos analíticos ^{4,5}. Aunque con pequeñas diferencias de nomenclatura, todos ellos se basan en el estudio de los mismos parámetros de calidad. En los trabajos recogidos en esta memoria se ha utilizado como guía para la validación de los métodos de análisis la guía de la *International Conference on Harmonisation* ⁶ (ICH). Esta guía fue redactada para la validación de métodos cromatográficos, ya que eran los métodos más utilizados en control de calidad. En esta memoria se ha trabajado básicamente con electroforesis capilar y con espectrofotometría en el infrarrojo cercano (NIR). Para la validación de los métodos de análisis por electroforesis capilar, debido a ser una técnica de separación, se han seguido las indicaciones de las guías ICH. Sin embargo, debido a las especiales características de la técnica NIR y a la falta de normativa específica para validación de métodos NIR, para validar las metódicas NIR desarrolladas en esta memoria se han adaptado las normas ICH a las características de la técnica. En Marzo de 2001, la EMEA ha determinado en un Concept Paper⁷ que es necesaria la redacción de una guía para el correcto uso de la técnica NIR para su aplicación en la industria farmacéutica y que la adaptación de la monografía sobre NIR recogida en la Farmacopea Europea⁸ no resulta suficiente. Actualmente ya existe una comisión, formada por especialistas en NIR de todo el mundo y con la cual hemos colaborado, encargada de redactar unas guías para la validación de metódicas NIR de análisis, tanto cualitativas como cuantitativas.

1.4.1. Parámetros de calidad

Para que un método de análisis pueda ser validado, es necesaria la determinación y evaluación de una serie de parámetros que definen la calidad del método de ensayo. Dependiendo de la naturaleza y la finalidad del método analítico los parámetros a evaluar son distintos. En la tabla 1.2 se muestran de forma esquemática, los parámetros de calidad que suelen utilizarse en validaciones y cuáles de ellos deben ser evaluados, según la ICH, dependiendo del ensayo realizado. Tras la tabla se comenta cada uno de los parámetros de calidad, utilizando para ello la terminología usada por ICH. Puesto que se ha utilizado la espectroscopia NIR, y debido a las características de esta técnica, las estrategias para la validación son distintas que para las técnicas convencionales. Por ello, además de la definición ICH de cada parámetro y cómo se evalúa para los métodos de análisis convencionales, se explican las características especiales de la técnica NIR y cómo se evalúa cada parámetro para un método de análisis desarrollado mediante esta técnica espectroscópica. En algunos casos se ha seguido el borrador mencionado sobre validación de métodos NIR.

Tabla 1.2. Parámetros de calidad a evaluar en la validación de distintos ensayos analíticos.

	Identificación	Determinación de contenido	Test impurezas	
			Cuantitativo	Límite
Selectividad (2)				
Precisión: Repetitividad				
Precisión Intermedia		(1)	(1)	
Exactitud				
Linealidad				
Intervalo				
Límite de detección			(3)	
Límite de cuantificación				

No evaluado habitualmente

Evaluado habitualmente

- (1) No es necesaria si se evalúa la reproducibilidad del método
- (2) La falta de especificidad del método puede ser compensada con otros métodos
- (3) Puede resultar necesario en algunos casos

1.4.1.1. Selectividad

La selectividad de un método, también denominada especificidad por algunas guías de validación, es la capacidad del método para asegurar que se está evaluando el analito de interés en presencia de una matriz con otros componentes. Dependiendo del objetivo del método, los procedimientos necesarios para evaluar la selectividad son diferentes. ICH distingue dos categorías en la evaluación de la selectividad: para tests de identificación y para métodos cuantitativos.

- **Identificación:** es la confirmación de la identidad del analito en cuestión. Una correcta identificación debe ser capaz de discriminar entre el analito y compuestos muy parecidos presentes en la matriz. Esto puede confirmarse obteniendo resultados positivos al comparar con muestras de referencia de identidad perfectamente conocida o que contengan el analito, en conjunción con resultados negativos con muestras que no lo contienen.
- **Métodos cuantitativos:** éstos incluyen determinación de contenido y tests de impurezas. Cuando se pretende validar un método cuantitativo, es necesario también evaluar su selectividad. Esto implica demostrar que se discrimina entre el analito a determinar de impurezas y/o excipientes. Cuando se utilizan métodos cromatográficos, la correcta separación entre los componentes de la muestra se utiliza para demostrar la selectividad. Para métodos poco selectivos, como es el caso de métodos espectrofotométricos, pueden utilizarse otros métodos analíticos para suplir la falta de selectividad.

En concreto, en espectroscopia NIR suele determinarse la selectividad mediante la identificación del producto en cuestión en una biblioteca construida a partir de muestras cuya identidad se conoce por otros métodos. Estas bibliotecas contienen los productos a analizar, junto con otros productos, componentes y placebos de los mismos, los cuales debe ser capaz de diferenciar.

1.4.1.2. Linealidad

Demostrar la linealidad de un método implica obtener, en todo el intervalo de concentraciones estudiado, una respuesta proporcional entre la concentración del analito y la magnitud física medida, descrita correctamente por el modelo o ecuación de calibración. En casos de calibraciones univariadas, la evaluación de la linealidad es directa: obtener una

relación lineal entre la concentración y el parámetro medido (absorbancia a una longitud de onda, área de pico...). Cuando se trabaja con calibraciones multivariadas, resulta más complicado evaluar la linealidad.

Adaptando lo propuesto en las guías ICH, para comprobar la linealidad de un método multivariable se puede proceder representando los valores obtenidos por el método frente a valores de referencia perfectamente conocidos. Es recomendable realizar un mínimo de cinco medidas que cubran el intervalo de concentraciones del método, utilizando muestras obtenidas por dilución de soluciones patrón (preparadas por pesada) o bien preparando muestras sintéticas (pesada y mezcla de los componentes de la muestra).

1.4.1.3. Intervalo

Es el intervalo entre los niveles extremos de concentraciones que puede ser determinado de forma precisa, exacta y lineal. Este parámetro se deriva generalmente de los estudios de linealidad, exactitud y precisión. Dependiendo del tipo de análisis que se realice, el intervalo de concentraciones mínimo a cubrir varía. La ICH aconseja cubrir intervalos de 80-120 % para análisis cuantitativo o bien 70-130 % para tests de uniformidad de contenido. En espectroscopia NIR el intervalo adecuado dependerá de la finalidad del método. Es posible que se determinen propiedades que cubran intervalos de trabajo muy grandes, o bien que en otros casos la magnitud medida varíe muy poco. En cada caso se debe evaluar qué intervalo de trabajo es el adecuado y comprobar que la evaluación de este intervalo es posible, ya sea por falta de sensibilidad o bien por dificultad en la preparación de muestras que cubran ese intervalo.

1.4.1.4. Exactitud

La exactitud de un método analítico expresa la proximidad entre los valores obtenidos por dicho método con los valores reales (obtenidos mediante pesada de un estándar) o bien con valores obtenidos por un método de referencia adecuado. En algunos textos, el concepto de exactitud se denomina veracidad, siendo entendida la exactitud como un concepto superior, dependiente de la veracidad y la precisión. Esto se deriva del hecho que puede interpretarse que la obtención de valores exactos, éstos deban ser próximos al valor real pero además sean determinados de forma precisa.

La ICH recomienda realizar un mínimo de 9 determinaciones, cubriendo tres niveles de concentración (3 niveles x 3 replicados). Para preparados farmacéuticos, puede evaluarse la exactitud realizando un mínimo de 6 determinaciones distintas. Lo habitual es realizar un

test de diferencias entre los valores obtenidos y los valores reales que permita evidenciar la existencia de algún error sistemático en el método de análisis.

La exactitud en un método NIR se suele evaluar de forma similar a la expuesta para los demás métodos: con el método NIR se determina el contenido o la magnitud que mida el método, en muestras cuyo contenido ha sido determinado mediante métodos de referencia adecuadamente validados. Se suele evaluar un número mayor de muestras que para otros métodos, que sean procedentes de lotes o partidas distintas, comprobando así que las posibles variaciones entre lotes no afectan los resultados proporcionados por el método. Igual que antes, se realiza un test de diferencias con los valores NIR frente a los valores de referencia.

1.4.1.5. Precisión

Es una medida del error aleatorio asociado al método analítico. Expresa la proximidad de una serie de resultados obtenidos a partir de distintas tomas de muestra de un producto perfectamente homogéneo.

Los resultados pueden expresarse en términos de desviación estándar absoluta o bien relativa (%CV). El nivel de exigencia de los resultados dependerá del tipo de muestra y del método utilizado. Según la ICH, existen tres niveles distintos en la evaluación de la precisión:

- Repetitividad:

Expresa la precisión de un método bajo las mismas condiciones de operación y en un intervalo de tiempo corto. La manera habitual de proceder es realizar 9 determinaciones a 3 niveles de concentración (3 niveles x 3 replicados) o bien un mínimo de 6 determinaciones al 100% de la concentración nominal. Los métodos habituales de análisis implican pretratamiento de la muestra, por lo que la repetitividad debe realizarse incorporando esta etapa. Por contra, los métodos NIR no implican pretratamiento, por lo que la repetitividad del método evalúa la precisión de la medida y del cálculo del modelo.

- Precisión intermedia:

Expresa el grado de reproducibilidad de una serie de resultados variando las condiciones operacionales normales. Factores típicos que se estudian son: diferentes analistas, días, lotes de reactivos, temperatura...No es

necesario el estudio de cada uno de estos factores por separado. Por lo general, la precisión intermedia se expresa mediante un CV global, de resultados obtenidos variando estos factores. Es recomendable realizar un diseño experimental para evaluar la influencia de los factores sobre los resultados. De la misma forma que en la evaluación de la repetitividad, al no haber tratamiento de muestra ni uso de reactivos, los únicos factores que pueden afectar la calidad de los resultados son los analistas y el tiempo. Por ello para la precisión intermedia de un método NIR se suele evaluar el factor día y el factor analista, realizando medidas en días distintos diferentes analistas.

- Reproducibilidad:

Generalmente, un estudio de reproducibilidad implica estudios de colaboración interlaboratorio. Es un estudio de precisión intermedia, ampliando como factor adicional distintos laboratorios. Este parámetro es de obligada consideración para la estandarización del método de análisis, para que adopte carácter de método oficial de análisis en farmacopeas. No obstante, para realizar un ensayo interlaboratorio de un método NIR, se debe realizar una transferencia del modelo de calibración de un instrumento a otro, lo cual no está todavía bien establecido. El borrador de validación de métodos NIR asume que no es necesario el ensayo interlaboratorio para validar métodos NIR.

1.4.1.6. Límite de detección

El límite de detección se define como la cantidad más pequeña de analito que puede ser detectada en una muestra, aunque no sea posible determinarla exactamente a ese nivel de concentración. La determinación de este valor depende de la naturaleza del método de análisis. Existen diversas aproximaciones para obtener este valor:

- Inspección visual en métodos no instrumentales, como cromatografía de capa fina o valoraciones.
- Cálculos estadísticos basados en la relación señal/ruido, aplicables a métodos con línea base.
- Cálculos estadísticos basados en la desviación estándar de la respuesta obtenida, ya sea de los valores obtenidos o bien de parámetros de la curva de calibración o del blanco.

Este es un parámetro necesario para métodos de análisis de trazas, y puede ser necesario para métodos utilizados en tests de uniformidad de contenido y tests de disolución.

1.4.1.7. Límite de cuantificación

Es el nivel de concentración mínimo que puede ser determinado de forma exacta y precisa bajo las condiciones operacionales normales. Es un compromiso entre la concentración de analito y la precisión y exactitud deseadas. Se suelen utilizar para su cálculo los mismos parámetros que en el límite de detección, aunque con criterios de aceptación ligeramente distintos.

Tanto el límite de detección como el de cuantificación no son parámetros habituales que se determinen en métodos NIR. No obstante en algunos casos puede resultar necesario el cálculo de estos parámetros. Esto lleva implícito una dificultad conceptual, puesto que no está claro cuál es el modo de proceder para la determinación del límite de detección/cuantificación de modelos de calibrado multivariados. En el caso del límite de cuantificación parece ser que vendría definido como el nivel más bajo del intervalo que cubra el modelo de calibración. No obstante el límite de detección resulta más complejo. Existen varias propuestas, ninguna de ellas aceptadas todavía como válidas por la IUPAC.

1.4.1.8. Robustez

Es la evaluación de la susceptibilidad del método de análisis a variaciones de las condiciones analíticas, como variaciones en reactivos (disolventes, fases móviles, pHs...) y variaciones instrumentales (temperatura, flujo...). En el caso de determinar que hay parámetros que afectan al método de análisis, éstos deberán ser controlados y los procedimientos del método deberán incluir recomendaciones de cómo mantenerlos bajo control estricto.

Algunos textos denominan a la capacidad del método de proporcionar valores exactos a pesar de pequeñas variaciones del procedimiento analítico con el nombre de Inercia. En estos textos se distingue entre variaciones extrínsecas del procedimiento (reactivos, operadores, aparatos...) englobándolas bajo el término Solidez, o intrínsecas del procedimiento (pequeñas modificaciones de variables del método) a las que engloba la Robustez.

BIBLIOGRAFÍA

- ¹ ISO, Guide 25, *General Requirements for the Competence of Calibration and Testing Laboratories*, 1990.
- ² *Normas Sobre Medicamentos de la Unión Europea, Volumen 4: Normas de Correcta Fabricación. Medicamentos de Uso Humano y Medicamentos Veterinarios*, 1999.
- ³ Directiva 91/356/CEE. *Principios y Directrices de las Prácticas Correctas de Fabricación de los Medicamentos de Uso Humano*, 1991.
- ⁴ *A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*, Eurachem Guide, Teddington, UK, 1998.
- ⁵ *Analytical Procedures and Methods Validation*, Draft Guidance, CDER/CBER, FDA, Rockville, MD, USA, 2000.
- ⁶ *ICH Q2B: Validation of Analytical procedures: Methodology*, Consensus Guideline, International Conference on Harmonisation (ICH), 1998.
- ⁷ *CPMP/ CVMP Note for Guidance on the Use of Near Infrared Spectroscopy by the Pharmaceutical Industry and the Data to Be Forwarded in the Part II of the Dossier for a Marketing Authorisation*, CPMP/QWP/160/01-EMEA/CVMP/111/01, London, 2001.
- ⁸ *European Pharmacopoeia Third Edition*, Council of Europe, Strasbourg, 1997.