

***Analytical
validation,
registrare in Brasile
RDC 166***

Capitolo I, sezione I

- Art. 1 - Questa disposizione stabilisce i criteri per la validazione dei metodi analitici

Capitolo I, sezione II

- Art. 2 - Questa risoluzione si applica ai metodi analitici utilizzati su prodotti farmaceutici, prodotti finiti, prodotti biologici in tutti gli stadi di produzione

Capitolo I, sezione III

- Art. 3 - Per quanto segue sono adottate le seguenti definizioni:

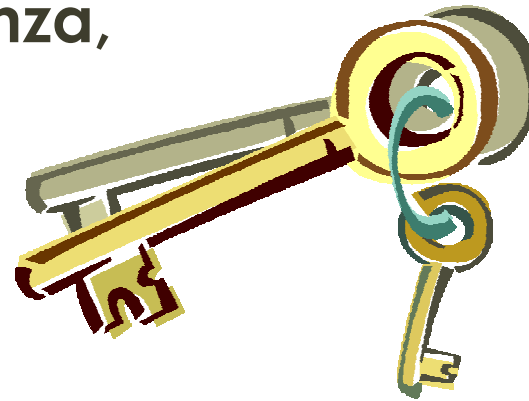
Ah! Ma è il glossario! Che ce ne frega...

...Però:



III – caratterizzazione chimica: è il gruppo di analisi che inequivocabilmente assicura la corrispondenza di una sostanza alla struttura attribuita (autenticità) e la sua qualità, rispetto a identità, purezza, titolo, e deve includere i dati ottenuti dalle tecniche applicate per la caratterizzazione stessa, come, analisi termogravimetrica, punto di fusione, calorimetria differenziale, spettro infrarosso, spettroscopia di massa, risonanza magnetica nucleare, analisi elementare, diffrazione dei raggi x, potere rotatorio specifico, test cromatografici, eccetera.

E qui cominciano i problemi, perché non pensiate di poter selezionare tra questo mazzo le chiavi che realmente servono a caratterizzare la sostanza,



perché i Brasiliani ve le chiederanno tutte, a prescindere dal fatto che servano o no a qualificare il vostro standard.

XVII – Purezza cromatografica: assenza di interferenza nel segnale cromatografico dell'analita.

XVIII – Purezza del picco: valutazione dell'omogeneità spettrale di un picco cromatografico atta a stabilirne la purezza.

● *ANVISA inizia poi a fare dei distinguo sui vari livelli di standard:*

XXII – Standard di riferimento caratterizzato (CRS)

XXIII – Standard di riferimento di farmacopea (PRS)

XXIV – Working standard (WS)

Capitolo II

- Art. 5 - L'utilizzo di un metodo analitico che non è descritto in una farmacopea ufficiale riconosciuta da ANVISA, richiede una validazione analitica in accordo ai parametri stabiliti da questa risoluzione.
- Art. 6 - I parametri tipici (**leggete obbligatori**) da considerare in una validazione dipendono dal tipo di test e sono descritti nella tabella 1 dell'annesso 1.

TABLE

Type of analytical procedure	IDENTIFICATION	TESTING FOR IMPURITIES	ASSAY
characteristics		quantitat. limit	- dissolution (measurement only) - content/potency
Accuracy	-	+	+
Precision			
Repeatability	-	+	+
Interm. Precision	-	+(1)	+(1)
Specificity (2)	+	+	+
Detection Limit	-	-(3)	-
Quantitation Limit	-	+	-
Linearity	-	+	+
Range	-	+	+

- signifies that this characteristic is not normally evaluated

+ signifies that this characteristic is normally evaluated

(1) in cases where reproducibility (see glossary) has been performed, intermediate precision is not needed

(2) lack of specificity of one analytical procedure could be compensated by other supporting analytical procedure(s)

(3) may be needed in some cases

- **Art 7 - I metodi analitici descritti in una farmacopea devono avere una dimostrazione di funzionalità (suitability for the intended use) tramite la presentazione di una validazione ridotta.**

Ad oggi tutti abbiamo sentito parlare di compendial validation senza che ne vengano definiti i termini in modo mandatorio. ANVISA prende l'iniziativa e stabilisce come si fa una validazione ridotta:

- Art. 8 - La validazione parziale include, almeno, **la precisione, l'accuratezza e la selettività**

§ 1° Nel caso di metodi analitici destinati ad quantificare le impurezze, la validazione parziale deve includere **i limiti di quantificazione**.

§ 2° Nel caso di limit test, al posto dei parametri principali, devono essere valutati selettività e limite di rilevabilità.

- **Art. 9 - In caso di trasferimento del metodo tra laboratori, viene considerato effettuato tramite una validazione ridotta.**

E' evidente come queste disposizioni rendano l'utilizzo di laboratori esterni estremamente oneroso.

Capitolo III

Standard di riferimento.

- **Art. 14 - Nella validazione di un metodo analitico devono essere utilizzati standard di farmacopee (PRS) riconosciute da ANVISA.**

Questo era uno degli aspetti più critici della regolamentazione brasiliana. Nella RDC 166 viene offerta un a scappatoia, ma a caro prezzo:

§ 1° L'uso di CRS è consentito sulla base della presentazione di un report di caratterizzazione del lotto specifico.

- **Art. 15** - In funzione dell'analita, il report di caratterizzazione deve contenere dati ottenuti dalle tecniche applicabili alla caratterizzazione di ogni sostanza: analisi termogravimetrica, punto di fusione, calorimetria differenziale, spettro infrarosso, spettroscopia di massa, risonanza magnetica nucleare, analisi elementare, diffrazione dei raggi x, potere rotatorio specifico, test cromatografici, eccetera.

§ 1° In aggiunta ai dati di caratterizzazione le seguenti informazioni devono essere presenti nel report:

- I Lotto e data di scadenza della sostanza
- II Denominazione brasiliana o denominazione internazionale
- III N° di CAS
- IV Nome chimico
- V Sinonimi
- VI Struttura
- VII Peso molecolare
- VIII Forma fisica
- IX Proprietà chimico fisiche (*ma perché? Possono essere diverse da quelle del prodotto?*)
- X Profilo delle impurezze
- XI Condizioni di uso e conservazione
- XII Report analitico descritto all'articolo 15

- **Art. 18 - L'utilizzo di WS (Working standard) nelle validazioni analitiche non è consentito.**

Su questo ultimo punto sarebbe bello se ANVISA ci spiegasse quali sono le ragioni scientifiche per cui il working standard che utilizziamo nelle analisi di tutti i giorni non può essere utilizzato per le validazioni.

Capitolo III, Sezione I

SELETTIVITA'

- Art. 19 - La selettività di un metodo analitico deve dimostrare la sua capacità di identificare in modo univoco gli analiti in presenza di altri componenti come impurezze, diluenti e matrici complesse.

In caso di metodi cromatografici, la purezza del segnale dell'analita (purezza del picco) deve essere evidenziata, con l'esclusione dei prodotti biologici.

Peccato che a parte i detector UV altre tecniche analisi di purezza del picco sono poco diffuse!

Intanto per le selettività se si presenta un metodo HPLC con detector UV è obbligatorio presentare gli indici di purezza dei picchi (impurezze comprese).

- Art 21 - Ripete gli stessi concetti dell'articolo 19° aggiungendo un sotto-paragrafo:

§ 1° Per evidenziare l'assenza di prodotti di degradazione è necessario esporre il campione a condizioni di degradazione a diversi pH, ossidative, calore e luce.

Secondo me questa è una richiesta concettualmente sbagliata. La validazione, di cui fa parte la selettività, è una caratteristica del metodo analitico. Le impurezze di degradazione sono una caratteristica del prodotto e, una volta identificate, sono delle impurezze come le altre. Considerare gli stress test come un esercizio di validazione è, dal punto di vista scientifico, un errore.

Capitolo III, Sezione II

LINEARITA'

- Art. 25 - La linearità deve essere valutata su almeno 5 differenti concentrazioni di Reference Standard, **in triplicato, da soluzioni indipendenti.**

L'indipendenza nella preparazione delle soluzioni è indispensabile perché la variabilità sia distribuita in modo casuale. In caso contrario non sarebbe possibile applicare nessuna delle valutazioni statistiche richieste in seguito.

Le soluzioni utilizzate nella linearità devono essere preparate indipendentemente, ma le soluzioni possono essere diluite dalla stessa soluzione madre di Reference Standard.

Concessione utile in caso di disponibilità limitata di impurezze.

○ Art. 27 - Per la valutazione della linearità devono essere presentati i seguenti dati:

- I - Rappresentazione grafica della risposta
- II - Residual plot
- III - Retta di regressione
- IV - Coefficienti r e r^2

**Vengono poi richiesti dei test statistici specifici:
verifica dell'omoschedasticità, della
regressione, verifica che la pendenza sia
diversa da 0.**

Capitolo III, Sezione III

EFFETTO MATRICE

- Art. 28 - Questa disposizione si applica alle matrici complesse
- Art 29 - L'effetto matrice viene valutato confrontando le pendenze di una curva di calibrazione (linearità) ottenuta dal Reference standard in solvente e da una matrice fortificata con il Reference Standard.
- Art 30 - Deve essere effettuato un test di parallelismo tra le rette.

Capitolo III, Sezione IV

CAMPO DI LAVORO

- Art 31 - Il campo di lavoro deve essere definito partendo dagli studi di linearità, assieme alla precisione e all'accuratezza in funzione dell'uso del metodo.

Fin qui sembra tutto normale, però:



o Art. 32 - I seguenti campi di lavoro devono essere utilizzati:

- I - Per il titolo da 80% a 120%.
- II - Per l'uniformità del titolo da 70% a 130%.
- III - Per i dissolution test da -20% della concentrazione inferiore attesa a +20% della concentrazione superiore attesa.
- IV - Per la determinazione delle impurezze dal Limite di Quantificazione al 120% della specifica.
- V - Per la determinazione simultanea di titolo e impurezze per normalizzazione delle aree, dal Limite di Quantificazione al 120% della concentrazione della sostanza attiva.

§1° Campi di lavoro più ampi di quelli definiti nella sezione principale devono essere tecnicamente giustificati.

Non provateci neppure ad applicare questo paragrafo! Se non rispettate i campi previsti i brasiliani si incazzano!



Capitolo III, Sezione V

PRECISIONE

- Art. 39 - I criteri di accettazione devono essere definiti e **giustificati** tendo conto dei seguenti aspetti:

- I - Utilizzo del metodo
- II - Variabilità intrinseca del metodo
- III - Concentrazioni di lavoro
- IV - Concentrazioni dell'analita nel campione**

Il punto IV ci porta direttamente all'equazione di HORWITZ.

$$CV\% = 2^{(1-0.5\log C)}$$

Chi ha avuto modo di vedere la bozza della RDC166 si ricorderà che questo concetto era presentato in forma di tabella allegata alla risoluzione. Per cui è ovvio che si vuole arrivare qui.

Dato che sull'equazione di Horwiz si potrebbero spendere delle ore faccio solo queste considerazioni:

I punti da I a III possono essere spesi per mitigare le conseguenze dell'applicazione di Horwiz

In particolare il punto II può essere utilizzato per giustificare tecniche analitiche che non seguono la legge di Horwiz ai livelli di concentrazione alti per limitazioni intrinseche.

Un esempio è la determinazione dei solventi residui per spazio di testa, dove il CV% per concentrazioni superiori ai 100 ppm non migliora e resta appena inferiore al 5%.

Il punto III per giustificare la deviazione dalla legge di Horwiz ai punti più bassi del campo di lavoro.

Capitolo III, Sezione VI

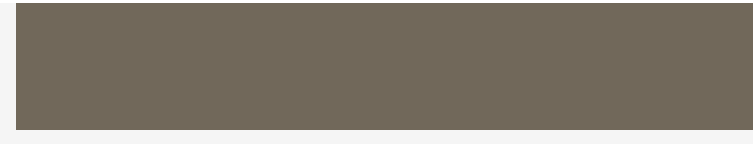
ACCURATEZZA

Gli articoli da 42 a 45 ripercorrono praticamente le ICH, quelli che possono creare problemi sono questi due punti:

- **Art 45 - Paragrafo singolo: In tutti i casi i calcoli per ottenere la concentrazione dell'analita devono essere uguali a quelli utilizzati dal metodo.**
- **Art. 48 - I criteri di accettazione per le percentuali di recupero e le deviazioni standard ottenute devono rispettare i criteri dell'articolo 39°.**

Come avevamo visto prima l'articolo 39° ci porta in zona legge di Horwiz e tabelle derivate. Se prendiamo una delle tipiche tabelle derivate dalla legge di Horwiz:

Analyte, %	Mass fraction (C)	Unit	Mean recovery, %
100	1	100%	98–102
10	10 ⁻¹	10%	
1	10 ⁻²	1%	97–103
0.1	10 ⁻³	0.1%	95–105
0.01	10 ⁻⁴	100 ppm (mg/kg)	90–107
0.001	10 ⁻⁵	10 ppm (mg/kg)	80–110
0.0001	10 ⁻⁶	1 ppm (mg/kg)	
0.00001	10 ⁻⁷	100 ppb (µg/kg)	
0.000001	10 ⁻⁸	10 ppb (µg/kg)	60–115
0.0000001	10 ⁻⁹	1 ppb (µg/kg)	40–120



Vediamo che il recovery per una impurezza allo 0,1% è 95 – 105%. Ma se stiamo validando, a seguito dell'articolo 8 un metodo di farmacopea dove non ci sono i fattori delle impurezze perché non sono stati considerati (caso delle impurezze non specificate) o perché il fattore non differisce per più del 20% da quello del prodotto, come facciamo?

In attesa della formazione di una storia regolatoria la domanda resta aperta.

Capitolo III, Sezione VIII

LIMITI di QUANTIFICAZIONE

- Art 55 - Il limite di quantificazione è la quantità più piccola di analita in un campione che può essere determinata con precisione ed accuratezza dal metodo oggetto della validazione
- Art 56 - Il limite di quantificazione deve essere coerente con le specifiche

- Art 57 - Per determinare questo parametro utilizzare gli approcci descritti nell'annesso II (contiene formule simili a quelle delle ICH)

In più il rapporto segnale/ rumore dovrà essere almeno 10:1.

- **Art. 60 - Precisione ed accuratezza devono essere testate al limite di quantificazione.**

Ma allora i metodi dell'articolo 57 non forniscono il limite di quantificazione! L'agente limitante sarà l'accuratezza!

Stando a questo approccio per ogni analita bisognerebbe testare più limiti di quantificazione finché il recovery non rientra nelle tabelle derivate dalla legge di Horwitz...

Approccio palesemente impraticabile, quindi non ci resta che rispondere utilizzando il paragrafo singolo dell'articolo 56: Per prodotti di cui sono stati stabiliti i limiti di reporting, i limiti di quantificazione devono essere migliori o uguale ai limiti di reporting stessi.

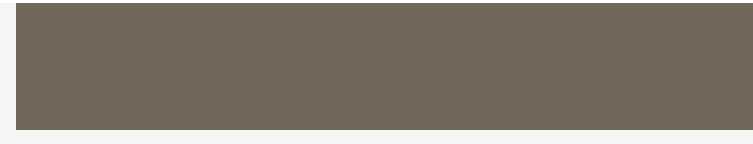
Capitolo III, Sezione VII

LIMITI di RILEVABILITA'

Questa sezione inizia con una domanda:

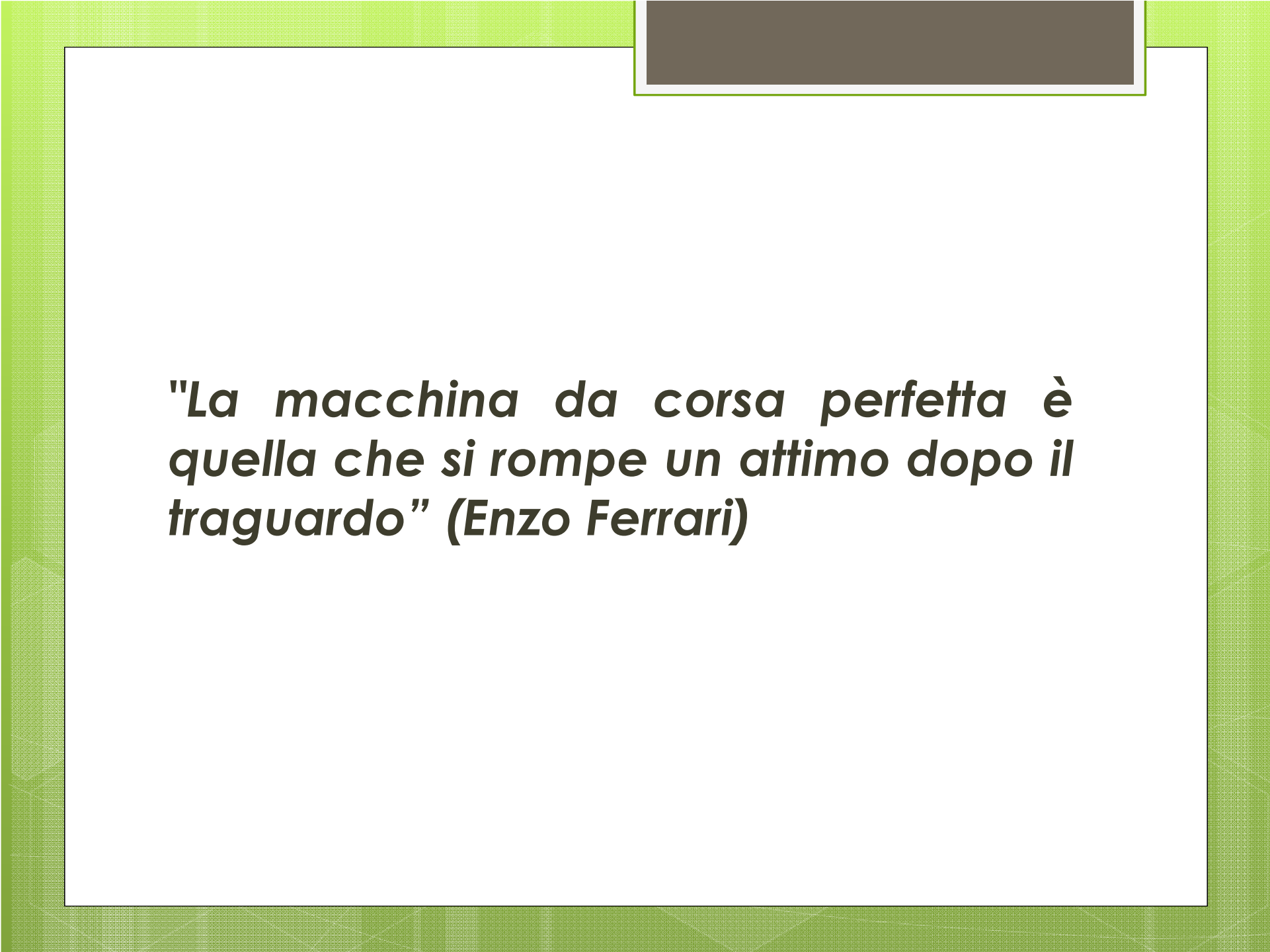
Secondo voi il responsabile di un laboratorio di controllo qualità è un pilota di formula uno o un autista d'autobus?



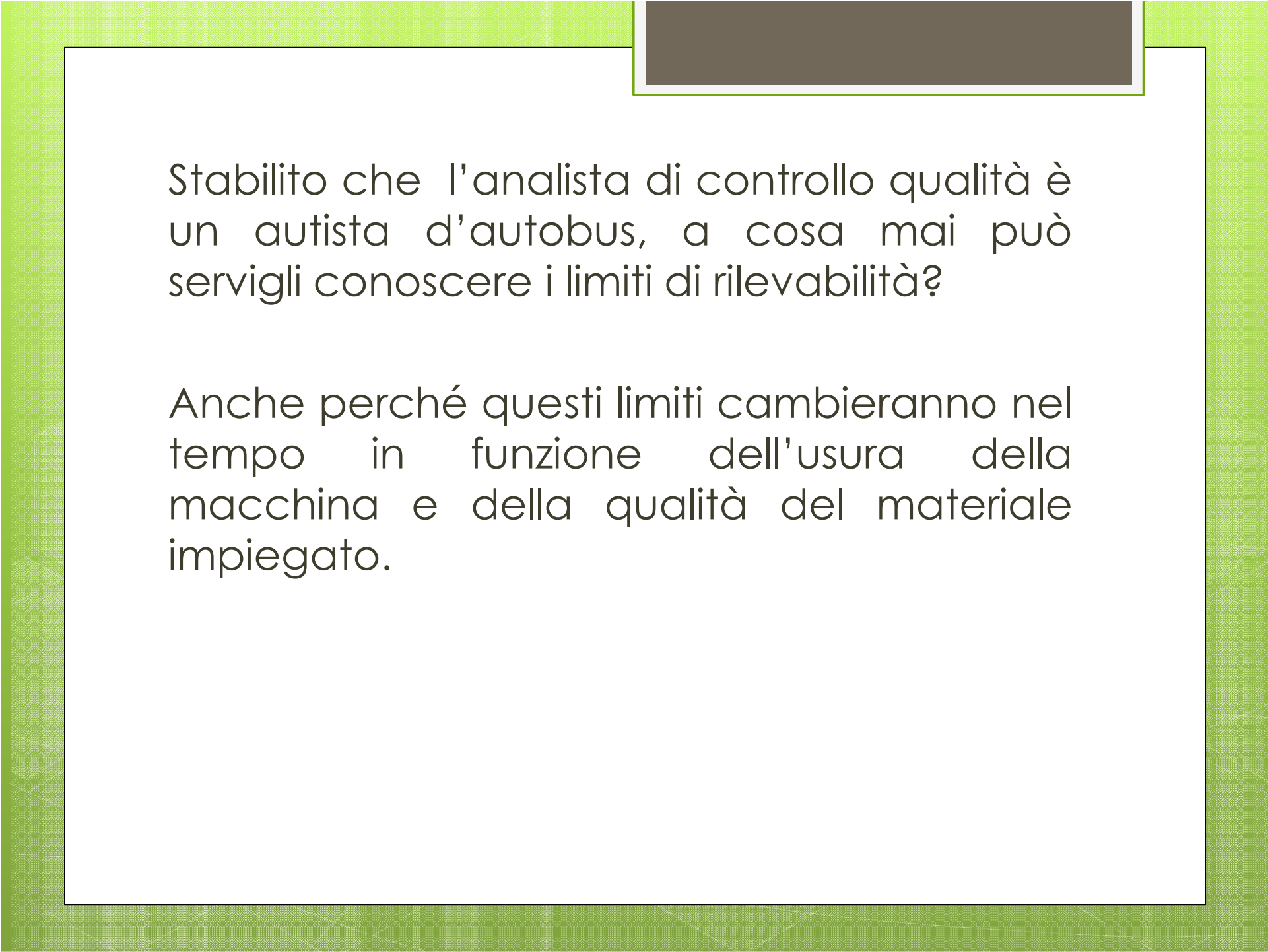


In altre parole il suo compito è di spremere il mezzo tecnico a sua disposizione per ottenerne la massima prestazione? o di portare in sicurezza i passeggeri dal punto A al punto B anche se il tempo non è tanto bello, le gomme hanno già fatto 40000 km e il motore è un po' spompato?

Se qualcuno avesse risposto “un pilota di formula 1” ricordo questa citazione:



"La macchina da corsa perfetta è quella che si rompe un attimo dopo il traguardo" (Enzo Ferrari)



Stabilito che l'analista di controllo qualità è un autista d'autobus, a cosa mai può servirgli conoscere i limiti di rilevabilità?

Anche perché questi limiti cambieranno nel tempo in funzione dell'usura della macchina e della qualità del materiale impiegato.

Il limite di rilevabilità serve solo in un caso specifico: un limit test dove, sfruttando al limite (o quasi) le prestazioni strumentali, vado a determinare la presenza o l'assenza di uno specifico contaminante.

"The LOD and limit of quantitation (LOQ) are two related quantities determined in the validation Category II procedures of <1225>. These are procedures for the determination of impurities or degradation products in DS and finished pharmaceutical products. Only one is needed for each use: LOQ for quantitative test and LOD of qualitative limit test"

Da USP <1210> , Pag. 7627

Il problema pratico è che se non metti i limiti di rilevabilità i brasiliani (e non solo) si incazzano!



Capitolo III, Sezione IX

ROBUSTEZZA

- Art. 62 - Per metodi quantitativi l'impatto delle variazioni sul risultato ottenuto deve essere verificato con gli stessi criteri utilizzati per l'accuratezza.
- Art. 64 - Deve essere verificata la conformità ai criteri di System Suitability.

Questi articoli, in combinazione con la Tabella I dell'annesso III, fanno della robustezza una delle parte più onerose della validazione secondo RDC-166. In partica per un metodo HPLC si tratta di ripetere l'accuratezza al 100% in 9 condizioni diverse.

GRAZIE DELLA PAZIENZA!

Si ringrazia la dottoressa Dora Dones per l'aiuto nella preparazione della presentazione e per la sua collaborazione nei rapporti con i brasiliani incazzati!