Ministério da Saúde
Agência Nacional de Vigilância Sanitária

RESOLUÇÃO - RDC Nº 27, DE 17 DE MAIO DE 2012

VALIDAÇÃO DE MÉTODOS BIOANALÍTICOS

Profa Dra Maria Eugênia Costa Queiroz

VALIDAÇÃO ANALÍTICA

- MINIMIZAR ERROS
- OBTENÇÃO DE RESULTADOS CONFIÁVEIS
- VARIAÇÕES ANALÍTICAS LIMITES PRÉ-ESTABELECIDOS (aceitáveis)
- **APROPRIADO - FINALIDADE PRETENDIDA**

AGÊNCIAS REGULAMENTADORAS BRASIL

Conformidade com normas internacionais

EUROPEAN MEDICINES AGENCY
SCIENCE MEDICINES HEALTH

U.S. FOOD & DRUG ADMINISTRATION

- Resolução RDC n.27 – ANVISA 17/05/2012 Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos
- **INMETRO, Revisão 01 – março de 2003 Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos DOQ- CGCRE – 008**
- **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento . Secretaria de defesa Agropecuária - Instrução Normativa DAS n. 46 - 10 de junho de 2003**

Ministério da Saúde
Agência Nacional de Vigilância Sanitária

RESOLUÇÃO - RDC Nº 27, DE 17 DE MAIO DE 2012

Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos.

DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

LC-MS
LC-MS-MS
CG-MS
CG-MS-MS

- ESCOLHA ADEQUADA DAS AMOSTRAS
  sangue, soro, plasma ou urina
- TEMPO DE COLHEITA DO MATERIAL
- FAIXA LINEAR OU INTERVALO DINÂMICO
- ESCOLHA DA METODOLOGIA ANALÍTICA
- ADEQUAÇÃO DA METODOLOGIA ÀS CONDIÇÕES LABORATORIAIS

LISTA DE VERIFICAÇÃO DE RECEBIMENTO DAS AMOSTRAS	
1. N do Estudo:	
2. Princípio Ativo:	
3. Origem:	
4. Coordenador Responsável pelo envio:	
RECEBIMENTO	
5. Data:	6. Hora:
7. Responsável:	
8. Livro de registro (n e página) :	
CONDIÇÕES DAS AMOSTRAS	
9. Embalagem:	
10. Rotulagem:	
11. Quantidade recebida:	
12. Temperatura no interior do recipiente de Transporte:	
13. OBSERVAÇÕES:	
TRANSPORTE	
14. Responsável:	
15. Data e horário do embarque::	
16. Tipo de gelo utilizado:	
17. OBSERVAÇÕES:	
ASSINATURAS DOS RESPONSÁVEIS	
18. Recebimento:	
19. Entrega:	
20. Coordenador da etapa Clínica:	
21. Coordenador da etapa Analítica:	
22. Pesquisador Principal:	

PADRÕES DE REFERÊNCIA

- Padrões secundários desde que seja comprovada sua certificação, na ausência de substâncias químicas de referência

Armazenamento adequado
- Local fresco, abrigo da luz
- baixa umidade, vedados
- Prazo de validade

Fármaco purificado
ou de elevado grau de pureza
Devidamente certificado

identidade e o teor sejam devidamente comprovados

Analisados por 03 ou mais laboratórios

Farmacopéia Brasileira ou USP
Empresas reconhecidas nacional ou internacionalmente *

* Possibilitem seu rastreamento

EQUIPAMENTOS

BALANÇA ANALÍTICA, CROMATÓGRAFOS, ...

CALIBRAÇÕES PERIÓDICAS

ANALISTAS

Qualificados
Adequadamente treinados

VALIDAÇÃO ANALÍTICA

PI marcado isótopo estável - MS

Padrão Interno (PI) – composto, geralmente com características estruturais similares ao analito, adicionado aos padrões de calibração e amostras em concentrações conhecidas e constantes, para facilitar a determinação do analito

- SELETIVIDADE
- LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO
- LINEARIDADE – EFEITO RESIDUAL
- EFEITO MATRIZ
- EXATIDÃO
- PRECISÃO INTER E INTRA ENSAIOS
- ESTABILIDADE

DEFINIÇÕES

- **Amostra branco: amostra de matriz sem adição de analito e padrão interno**
- **LIQ: limite inferior de quantificação**
- LSQ: limite superior de quantificação
- **CQB: 3 x LIQ**
- **CQM: LIQ - LSQ**
- **CQA: 75 – 85% - maior conc. Curva**
- **CQD: > LSQ**

amostra de controle de qualidade de diluição

LIMITE DE DETECÇÃO (LD) E QUANTIFICAÇÃO (LIQ)

CRITÉRIOS PRECONIZADOS

LD – razão sinal/ruído > 3
Sensibilidade do detector

~~LIQ – razão sinal/ruído > 5
Sensibilidade do método padronizado~~

LIQ – exatidão EPR <20%
CV ≤ 20
Menor ponto da curva analítica

SELETIVIDADE

* Condições de estresse: luz, calor, umidade, hidrólise e oxidação

- 04 Plasmas normais
- 01 lipêmico
- 01 Plasma hemolisado
- Sangue total
- 01 lipêmica

CO-ELUIÇÃO DE INTERFERENTES

ENDÓGENOS DA MATRIZ
METABÓLITOS
E PRODUTOS DE DECOMPOSIÇÃO *

CRITÉRIOS PRECONIZADOS

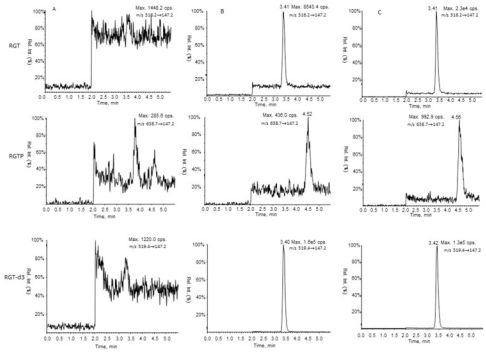
AMOSTRAS BRANCO DE SEIS PROCEDÊNCIAS DIFERENTES *

CRITÉRIOS PRECONIZADOS

RESPOSTA - PICOS INTERFERENTES NO MESMO tr ANALITO < 20% (LIQ)
NO MESMO tr PI INFERIORES 5%

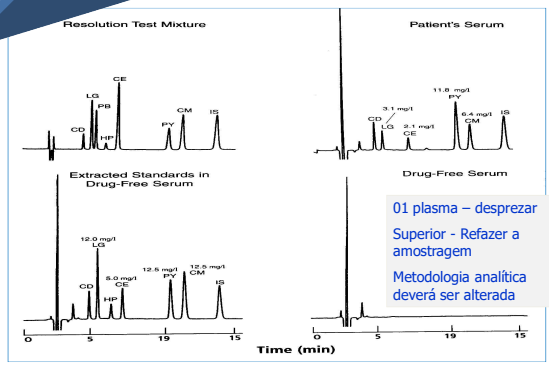
SELETIVIDADE

Typical MRM chromatograms of RGT, RGTB and IS (a) blank plasma, (b) the lowest calibration sample (LLOQ), and (c) a plasma sample obtained from a rat 6 h after intramuscular injection RGTB microsuspension



SELETIVIDADE

Avaliação individual de cada fármaco



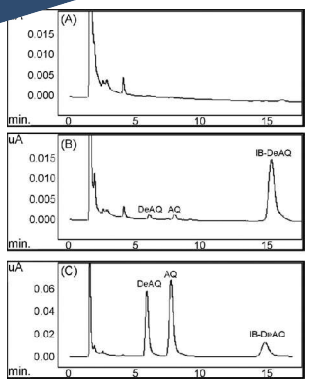
01 plasma – desprezar

Superior - Refazer a amostragem

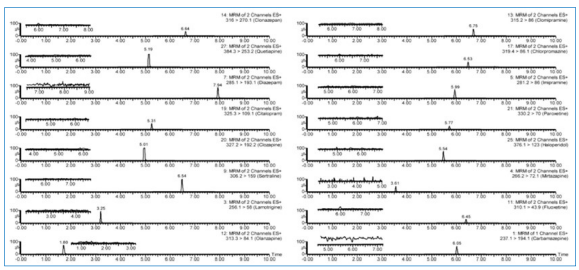
Metodologia analítica deverá ser alterada

SELETIVIDADE

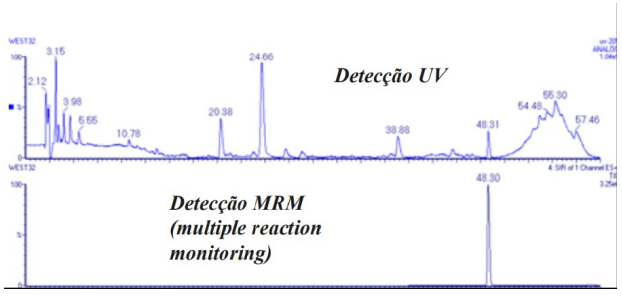
C.-S. Lai et al. / J. Chromatogr. B 877 (2009) 558–562



HPLC chromatogram of (A) extracted blank human plasma; (B) extracted human plasma containing AQ and DeAQ at 20 ng/ml (LLOQ) with IB-DeAQ; (C) extracted human plasma containing AQ and DeAQ at 1400 ng/ml with IB-DeAQ.



MEPS/LC–MS/MS chromatograms of a drug-free plasma sample (subscript on the left), and drug-free plasma sample spiked with psychotropic drug at LLOQ concentration.



SELETIVIDADE

MEDICAÇÃO DE USO CONCOMITANTE

Retention times of some tested drugs and metabolite

Drug	Retention time (min)
Lamotrigine	4.64
Phenobarbitone	5.33
Carbamazepine	8.85
Phenytoin	9.97
Carbamazepine-10,11-epoxide	5.08
Ethosuximide	3.56
Pentobarbitone	11.60
Diazepam	4.04
Quinidine	16.82
Alprazolam	14.45
Clonazepam	13.63
Thiopentone	10.33
Acetaminophen	1.42
Chloramphenicol	6.16
Acetylsalicylate	1.15
Lidocaine	78.86
Theophylline	1.23
Caffeine	2.01
Valproic acid	ND
Oxcarbazepine	ND
Vigabatrin	ND
Gabapentine	ND

ND: not detected within 10 min from injection

SELETIVIDADE

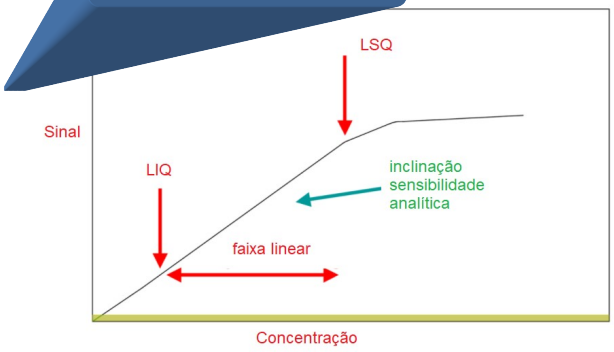
MEDICAÇÃO DE USO CONCOMITANTE

RETENTION INDICES RELATIVE TO INTERNAL STANDARD OF ANTI-EPILEPTIC DRUGS AND OTHER DRUGS AND METABOLITES

Compound	Retention index
Internal standard[a]	1.00
Phenobarbital	0.45
Carbamazepine	0.60
Phenytoin	0.83
Ethosuximide	0.30
Caffeine	0.31
Theophylline	0.31
Salicylate	0.31
Paracetamol	0.34
Primidone	0.37
Carbamazepine 10,11 epoxide	0.41
DP118	0.53
Morphine	0.54
Codeine	0.55
5-(*p*-Hydroxyphenyl)-5-phenylhydantoin	0.65
Clobazam	0.69
Methadone	1.39

[a]Retention time = 9.4 min.

LINEARIDADE



LINEARIDADE

Mesma matriz do estudo

FAIXA DE AVALIAÇÃO

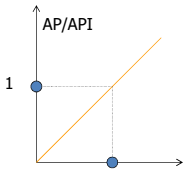
LIQ a 3 ordens de magnitude
6 calibradores (mínimo) n ≥ 3

Padrão interno

1:1 – ponto central da curva

ANÁLISE DE REGRESSÃO LINEAR

Equação regressão linear
coeficientes r ou R^2
Concentração calibradores – CV ≤ 15%*

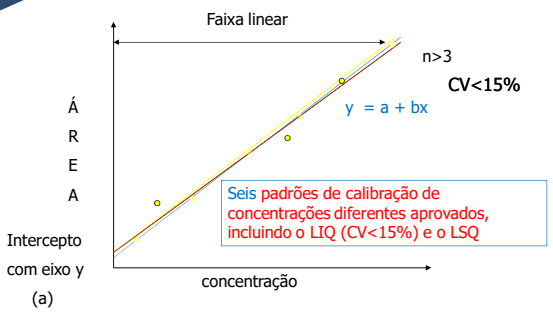


CRITÉRIOS PRECONIZADOS

calibradores : 20% rejeitados
(LIQ e maior concentração)

*LIQ: CV ≤ 20%

Linearidade



Á R E A

Intercepto com eixo y (a)

Simultaneous analysis of antioxidants and preservatives in cosmetics by supercritical fluid extraction combined with liquid chromatography–mass spectrometry☆

Journal of Chromatography A, 1120 (2006) 244–251

Compounds	Linear range (ng/g)	Correlation coefficient (R^2)
Methylparaben (MP)	10–1000	0.9955
Ethylparaben (EP)	20–2000	0.9969
Propylparaben (PP)	20–2000	0.9994
Butylparaben (BP)	20–2000	0.9987
Butylated hydroxyanisole (BHA)	200–20000	0.9992
Butylated hydroxytoluene (BHT)	200–20000	0.9989
α-Tocopherol (α-t)	200–20000	0.9954
α-Tocopherol acetate (α-ta)	20–2000	0.9967

LINEARIDADE

Table 1
Standard curve summary

Drug		Intercept	Slope	Correlation (r)
Lamotrigine ($n=6$)	Mean	0.0904	0.3836	0.9988
	S.D.	0.0108	0.0231	0.0017
	% CV	–	6.0208	0.1799
Phenobarbitone ($n=6$)	Mean	0.0125	0.2303	0.9988
	S.D.	0.0024	0.0161	0.0012
	% CV	–	7.0169	0.1223
Carbamazepine ($n=6$)	Mean	−0.0082	0.3821	0.9995
	S.D.	0.0029	0.0169	0.0002
	% CV	–	4.4384	0.0298
Phenytoin ($n=6$)	Mean	0.0254	0.2345	0.9995
	S.D.	0.0037	0.0086	0.0024
	% CV	–	3.6543	0.24991

EFEITO MATRIZ BIOLÓGICA
CQB e CQA

FMN

FATOR DE MATRIZ NORMALISADO

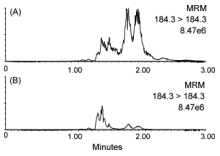
4 NORMAIS
2 HEMOLISADA
2 LIPÊMICAS

FMN = analito matriz/PI matriz / analito solução/PI solução

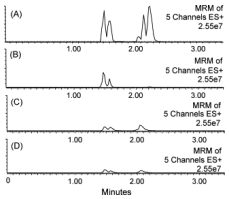
CV < 15%

Matrix effect from plasma samples spiked with analytes at LLOQ and ULOQ concentrations ($n=5$).

Analyte	MF LLOQ (%CV)	MF ULOQ (%CV)
Haloperidol	1.8	3.6
Olanzapine	3.3	3.0
Clonazepam	5.0	0.8
Mirtazapine	7.1	3.8
Paroxetine	5.8	4.8
Citalopram	12.2	3.2
Sertraline	6.8	11.0
Chlorpromazine	9.4	9.8
Imipramine	1.7	1.2
Clomipramine	4.8	1.2
Quetiapine	1.9	6.7
Diazepam	10.3	7.8
Fluoxetine	5.1	4.0
Clozapine	2.1	2.3
Carbamazepine	2.4	1.8
Lamotrigine	2.1	1.6



MRM transition detecting all phosphatidylcholine containing phospholipids from PPT samples using either (A) methanol or (B) acetonitrile as the precipitation solvent.



TICs of MRM transitions for five phospholipids remaining in final extracts after sample preparation by (A) acetonitrile PPT, (B) reversed-phase polymeric SPE, (C) silica-based pure cation exchange and (D) mixed-mode cation exchange SPE

Curva analítica
Análise quantitativa

*LIQ: CV ≤ 20%

FAIXA DE AVALIAÇÃO

LIQ a 120% (> conc.)
6 calibradores (mínimo) n = 3
Avaliar *carryover*

ANÁLISE DE REGRESSÃO LINEAR

Equação regressão linear
coeficientes r ou R^2
Concentração calibradores – CV ≤ 15%*

CRITÉRIOS PRECONIZADOS

calibradores : 20% rejeitados (4 de 6)
(LIQ e maior concentração)

PRECISÃO INTER E INTRA ENSAIOS

FAIXA DE AVALIAÇÃO

Branco referência enriquecido
LIQ, CQB, CQM, CQA e CQD
n ≥ 5

$$DPR = \frac{DP}{CMD} \times 100$$

*LIQ: CV ≤ 20%

Interensaios (precisão intermediária):
dias consecutivos, analistas diferentes
Intra-ensaio – mesmo dia, analista
e instrumentação

CRITÉRIOS PRECONIZADOS

CV ≤ 15 %*
Repetitividade – intra laboratorial
Reprodutibilidade – inter laboratorial

PRECISÃO INTER E INTRA ENSAIOS

Table 2. Precision study of antiepileptic drug assay in serum.

Drug	Within-day precision* Concentration/ μg ml⁻¹	Mean measured value/ μg ml⁻¹ ± s.d.	CV, %	Between-day precision† Concentration/ μg ml⁻¹	Mean measured value/ μg ml⁻¹ ± s.d.	CV, %
Phenobarbital	15	15.12 ± 0.30	1.98	15	14.79 ± 0.35	2.37
	30	30.65 ± 0.66	2.15	30	30.43 ± 0.88	2.89
	60	60.1 ± 1.30	2.16	60	61.22 ± 1.25	2.04
Phenytoin	7.5	7.79 ± 0.18	2.31	7.5	7.60 ± 0.24	3.16
	15	15.46 ± 0.18	1.16	15	15.38 ± 0.40	2.60
	30	29.70 ± 0.50	1.68	30	30.57 ± 0.66	2.16
Carbamazepine	3	3.17 ± 0.08	2.52	3	2.96 ± 0.10	3.38
	6	6.15 ± 0.12	1.95	6	6.17 ± 0.17	2.76
	16	16.27 ± 0.34	2.10	16	16.10 ± 0.42	2.61
HPPH	3	3.42 ± 0.11	3.22	3	3.21 ± 0.10	3.12
	6	6.26 ± 0.08	1.28	6	6.28 ± 0.19	3.03
	16	16.22 ± 0.22	1.36	16	16.22 ± 0.40	2.47

* Mean values represent 15 different serum samples for each value.
† Mean values represent 15 different serum samples analysed on different days for each value.

EXATIDÃO

FAIXA DE AVALIAÇÃO

Intra e inter corridas

Erro Padrão Relativo

Branco referência enriquecido
LIQ, CQB, CQM, CQA e CQD
n ≥ 5

EXATIDÃO - EPR

$$EPR\ (\%) = \frac{\text{Conc. média exp.} - \text{nominal}}{\text{Concentração nominal}} \times 100$$

CRITÉRIOS PRECONIZADOS

Exatidão (EPR 15%)
*LIQ: CV ≤ 20%

Exatidão (%EPR) e precisão (%CV) intra e interensaio para o método LC-MS/MS

Analito	Concentração adicionada (nmol mL⁻¹)	Exatidão (%EPR) n=5 Intra-ensaio	Exatidão (%EPR) n=5 Interensaio	Precisão (%CV) n=5 Intra-ensaio	Precisão (%CV) n=5 Interensaio
Haloperidol	0.075a	4.9	4.6	1.1	1.1
	0.225b	-3.3	-3.6	3.2	2.8
	20.5c	-2.9	-3.1	2.1	1.9
	32.5d	-0.2	-0.5	3.7	3.3
	40.5e	-0.8	-0.5	5.4	4.7
Olanzapina	0.075a	10.4	9.2	4.3	4.5
	0.225b	-3.0	-3.9	4.7	4.7
	20.5c	3.1	4.2	2.2	3.0
	32.5d	4.6	2.9	5.9	6.4
	40.5e	-1.1	-1.0	6.1	5.3
Clonazepam	0.625a	10.7	11.8	2.3	3.2
	1.875b	-6.0	-5.4	4.3	4.1
	80.0c	-2.9	-2.3	3.2	3.1
	125.0d	-2.4	-1.8	1.8	2.1
	155.0e	1.4	0.5	5.5	5.2
Mirtazapina	0.125a	-12.9	-11.9	1.5	2.3
	0.375b	-2.8	-2.0	4.2	4.0
	80.0c	1.2	2.9	5.1	5.6
	125.0d	-3.1	-3.3	6.5	5.6
	155.0e	1.0	1.2	4.8	4.1

Analyte	Linearity: Linear equation	R^2	Lack of fit[a]	Internal standard	Amount spiked (ng mL⁻¹)	Accuracy: Intra-assay	Accuracy: Inter-assay	Precision: Intra-assay	Precision: Inter-assay	Matrix effects
AEA	$y = 0.6935\ x - 0.0005$	0.9957	0.9944	AEA-d_5	0.1	−17.3	−15.0	20.0	19.9	
					0.3	−9.5	−8.5	8.0	7.1	5.9
					3.0	−1.7	−0.6	2.8	7.4	
					4.8	−3.7	−1.2	0.1	4.3	5.4
					6.0	−7.0	−2.9	1.2	4.8	
2-AG	$y = 2.1346\ x + 1.0027$	0.9957	0.1123	2-AG-d_4	0.04	17.2	16.4	20.0	13.9	
					0.12	10.6	14.2	1.5	5.77	9.4
					5.0	2.2	0.9	1.5	3.1	
					8.0	2.3	11	3.2	3.4	14.0
					10.0	−1.9	−0.9	1.7	2.8	

[a] p value at a significance level of 0.05

ESTABILIDADE

- 3 CICLOS DE CONGELAMENTO E DESCONGELAMENTO
- 3 ALÍQUOTAS DE CADA CONCENTRAÇÃO (CQB E CQA)
- CONGELAMENTO (12 h) E DESCONGELAMENTO (temperatura ambiente)
- Quantificando-se o fármaco após o terceiro ciclo SOB CONDIÇÕES DE ENSAIO
- Comparar resultados com análises das amostras recém preparadas

ESTABILIDADE DE CURTA DURAÇÃO

AMOSTRAS NO Auto-injetor

*4 a 24 hs

* Soluções padrão armazenadas sob refrigeração ou congelamento, a estabilidade também deve ser avaliada, contemplando a temperatura e o período de armazenamento das mesmas

- 3 ALÍQUOTAS DE CADA CONCENTRAÇÃO (BAIXA E ALTA)
- ANALISAR SUPERIOR O TEMPO DE BANCADA (METODOLOGIA) SOB CONDIÇÕES DE ENSAIO*
- ESTABILIDADE DAS SOLUÇÕES PADRÕES SOB CONDIÇÕES DE ENSAIO* (6 h – temperatura ambiente) CV<10%
- Comparar resultados com análises das amostras recém preparadas

ESTABILIDADE DE LONGA DURAÇÃO

CONGELAMENTO:
- 20° C a – 80° C

- 3 ALÍQUOTAS DE CADA CONCENTRAÇÃO (BAIXA E ALTA)
- CONGELAMENTO (- 20°C, -80ºC) E DESCONGELAMENTO (temperatura ambiente)
- ANALISADAS TEMPOS: ZERO. DOIS, QUATRO OITO, DEZESEIS DIAS ARMAZENAMENTO
- Exceder intervalo de tempo compreendido entre coleta da primeira amostra e a análise da última

Conditions	RGTB		RGT	
	0.2 ng/mL	8 ng/mL	0.2 ng/mL	8 ng/mL
bench-top storage (2 h at room temperature)	0.21 ± 0.02	7.97 ± 0.19	0.19 ± 0.02	7.86 ± 0.28
Three freeze-thaw cycles	0.21 ± 0.01	7.73 ± 0.09	0.19 ± 0.02	7.51 ± 0.14
Processed samples at room temperature for 24 h	0.20 ± 0.01	8.00 ± 0.14	0.21 ± 0.01	7.79 ± 0.14
Long-term storage at −35 °C for 90 days	0.19 ± 0.01	8.08 ± 0.11	0.19 ± 0.03	7.99 ± 0.05

CRITÉRIOS PARA AVALIAÇÃO ESTABILIDADE

As amostras serão consideradas estáveis quando não se observar desvio superior a 15% do valor obtido das amostras recém-preparadas, com exceção do LIQ, para o qual se aceita desvio de até 20%

CONTROLE DE QUALIDADE

10% total de amostras do lote - dispostas de maneira aleatória

* ESTAS AMOSTRAS QC SÃO SEPARADAS EM ALÍQUOTAS E CONGELADAS

* VALIDAÇÃO DO MÉTODO E DURANTE O ESTUDO

* DESVIO ≤ 15% (VALOR NOMINAL)

- CQI do limite inferior de quantificação
- CQ de baixa concentração (CQB): menor ou igual 3 x LIQ
- CQ de média concentração (CQM): aproximadamente média entre CQB e CQA
- CQ de alta concentração (CQA): 75 a 90% da maior concentração da curva de calibração

CONTROLE DE QUALIDADE

- DILUIÇÃO DE AMOSTRAS EM ANÁLISE DEVERÁ SER REALIZADA COM A MATRIZ BIOLÓGICA
- ADIÇÃO DE MATRIZ BIOLÓGICA QUANDO NÃO TEM O VOLUME DE AMOSTRA PADRONIZADO

CRITÉRIOS PARA AVALIAÇÃO CQ

VARIAÇÃO > 15% (VALOR NOMINAL).
AS AMOSTRAS CORRESPONDENTES ESTE CONTROLE DEVERÃO SER ANALISADAS NOVAMENTE

Internal Standards

An internal standard is used when performing bioanalysis with mass spectrometry detection. An appropriate internal standard will give a measure of control for extraction, HPLC injection and ionization variability. It is an essential component of a robust high throughput bioanalytical method.

The best internal standard for bioanalysis is an isotopically labelled version of the molecule you want to quantify. The stable labelled isotopes available to incorporate in a given molecule (drug or drug metabolite) are deuterium (2H or D), 13C and 15N. Generally, because of the abundance of hydrogen in organic molecules, the use of deuterium is preferred compared to 13C and 15N, which are generally more expensive solutions for stable labelled internal standards. For this reason, the term deuterated internal standards is often used.

Deuterated internal standards

Ideally in bioanalysis, a deuterated internal standard will have the same extraction recovery, ionization response in ESI mass spectrometry and the same chromatographic retention time. An important characteristic of a deuterated internal standard is that it should co-elute with the compound to be quantified. Also it should also contain enough mass increase to show a signal outside the natural mass distribution of the analyte. With this fact in mind, the design of a suitable deuterated internal standard can become a real challenge simply because the analyte of interest contains two chlorine atoms, for instance, and will need a +6 or +7 mass increase to show a signal not interfering with the analyte.

Your bioanalysis will be greatly improved by the use of deuterated internal standards. The chromatography time will be reduced and your assay will be more robust, as it will increase the throughput and lower your rejection rates.