



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ASISTENCIA EN TECNOLOGÍA Y  
DISEÑO DEL ESTADO DE JALISCO, A.C.

---

VALIDACIÓN DE MÉTODOS BIOANALÍTICOS CROMATOGRÁFICOS PARA  
FÁRMACOS: LEGISLACIÓN NACIONAL E INTERNACIONAL Y SU  
APLICACIÓN EN ESTUDIOS DE BIOEQUIVALENCIA, FARMACOCINÉTICA  
Y TOXICOCINÉTICA

# TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
**MAESTRO EN INVESTIGACIÓN CLÍNICA**

PRESENTA

**L.F. Alan Orlando Baranda Gómez**

Directora de Tesis: Dra. en C. Ana Laura Márquez Aguirre  
Co-Director de Tesis: Dra. en C. Tanya Amanda Camacho Villegas  
Asesor: Dra. en C. Erika Nahomy Marino Marmolejo

GUADALAJARA, JALISCO, ENERO, 2019.



Guadalajara, Jalisco a 18 de enero de 2019


CONSEJO INSTITUCIONAL DE POSGRADO  
DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ASISTENCIA EN TECNOLOGÍA Y DISEÑO  
DEL ESTADO DE JALISCO, A.C.  
PRESENTE

Los abajo firmantes miembros del comité tutorial del estudiante Alan Orlando Baranda Gómez, una vez leída y revisada la Tesis titulada "VALIDACIÓN DE MÉTODOS BIOANALÍTICOS CROMATOGRÁFICOS PARA FÁRMACOS: LEGISLACIÓN NACIONAL E INTERNACIONAL Y SU APLICACIÓN EN ESTUDIOS DE BIOEQUIVALENCIA, FARMACOCINÉTICA Y TOXICOCINÉTICA" aceptamos que la referida tesis revisada y corregida sea presentada por el estudiante para aspirar al grado de Maestro en Investigación Clínica durante el examen correspondiente.


Y para que así conste, firmamos la presente al día 18 del mes de enero del año dos mil diecinueve.



Dra. en C. Ana Laura Márquez Aguirre  
Director de tesis/tutor académico



Dra. en C. Tanya Amanda Camacho Villegas  
Co-director de tesis/tutor en planta



Dra. en C. Erika Nahomy Marino Marmolejo

## Agradecimientos

Quiero agradecer primeramente a Dios por ser el guía a través del camino de la ciencia.

A mi esposa *Wendy Adriana Mateo* por toda su comprensión y ayuda para cumplir con mis objetivos aún en los momentos más difíciles.

A mis Hijas *Ambar Camila Baranda Mateo* y *Jaspe Emily Baranda Mateo* por ser el principal motor de trabajo, ejemplo y esmero, mis mejores maestras y jueces.

Agradecer a mis padres *Lauro José Baranda González* y *Noemí Gómez Moreno* por el apoyo incondicional y empuje gratificante a cada una de mis metas.

Al *Dr. Jorge Herrera Abarca* por haber visto en mí un profesional comprometido y brindarme la oportunidad de conocer más acerca de la Investigación Clínica.

A la *Dra. Ana Laura Márquez Aguirre* por estar siempre resolviendo y apoyando ante todo problema y adversidad para terminar el postgrado.

A la *Dra. Tanya Amanda Camacho Villegas* y la *Dra. Erika Nahomy Marino Marmolejo* por sus valiosos comentarios y aportaciones a este trabajo.

Si buscas resultados distintos, no hagas siempre lo mismo.

*Albert Einstein.*

## Tabla de Contenido

<b>I.</b>	<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	<b>5</b>
<b>II.</b>	<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>5</b>
<b>III.</b>	<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>6</b>
<b>IV.</b>	<b>RESUMEN</b> .....	<b>9</b>
<b>1.</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>11</b>
<b>2.</b>	<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>12</b>
<b>3.</b>	<b>TIPO DE INVESTIGACIÓN</b> .....	<b>14</b>
<b>4.</b>	<b>ANTECEDENTES</b> .....	<b>15</b>
<b>5.</b>	<b>VALIDACIÓN</b> .....	<b>18</b>
5.1.	ANTECEDENTES HISTÓRICOS.....	18
5.2.	DEFINICIÓN.....	19
5.3.	LEGISLACIÓN NACIONAL E INTERNACIONAL PARA VALIDACIÓN DE MÉTODOS BIONALÍTICOS CROMATOGRÁFICOS.....	20
<b>6.</b>	<b>BIOANÁLISIS</b> .....	<b>25</b>
6.1.	ANTECEDENTES HISTÓRICOS.....	25
6.2.	DEFINICIÓN.....	26
6.3.	IMPORTANCIA DEL BIOANÁLISIS.....	27
6.4.	MÉTODOS BIOANALÍTICOS.....	27
6.4.1.	<i>Métodos colorimétricos</i> .....	27
6.4.2.	<i>Métodos cromatográficos</i> .....	28
<b>7.</b>	<b>BIOEQUIVALENCIA</b> .....	<b>33</b>
7.1.	DEFINICIÓN.....	33
7.2.	ESTUDIOS DE BIOEQUIVALENCIA.....	33
7.2.1.	<i>Regulación</i> .....	34
7.2.2.	<i>Métodos para demostrar la bioequivalencia</i> .....	35
<b>8.</b>	<b>FARMACOCINÉTICA</b> .....	<b>36</b>
<b>9.</b>	<b>TOXICOCINÉTICA</b> .....	<b>38</b>
<b>10.</b>	<b>DESARROLLO DE MÉTODOS Y VALIDACIÓN</b> .....	<b>39</b>
10.1.	PRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS (PP).....	40
10.2.	EXTRACCIÓN LIQUIDO-LÍQUIDO (LL) Y EXTRACCIÓN CON LÍQUIDO ASISTIDO (ELA).....	41
10.3.	EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (SPE) EN LÍNEA Y FUERA DE LÍNEA.....	42
10.4.	REQUISITOS DE UNA VALIDACIÓN.....	44
<b>11.</b>	<b>INTRODUCCIÓN A LOS PARÁMETROS DE VALIDACIÓN: DEFINICIONES, MÉTODOS Y CRITERIOS DE ACEPTACIÓN</b> .....	<b>47</b>
11.1.	SELECTIVIDAD.....	47
11.2.	EXACTITUD.....	48
11.3.	PRECISIÓN.....	48
11.4.	SENSIBILIDAD O LÍMITE INFERIOR DE CUANTIFICACIÓN (LIC).....	49

11.5.	CURVA DE CALIBRACIÓN (LINEALIDAD).....	49
11.6.	ESTABILIDAD. ....	50
11.7.	EFFECTO DE LA MATRIZ. ....	50
11.8.	RECOBRO .....	51
11.9.	REPRODUCIBILIDAD.....	51
11.10.	ESTÁNDARES DE REFERENCIA. ....	51
<b>12.</b>	<b>ANÁLISIS COMPARATIVO ENTRE LAS GUÍAS NACIONALES E INTERNACIONALES DE LOS PARÁMETROS DE VALIDACIÓN: DEFINICIONES, MÉTODOS Y CRITERIOS DE ACEPTACIÓN .....</b>	<b>52</b>
12.1.	SELECTIVIDAD Y ESPECIFICIDAD .....	53
12.1.1.	<i>Definición</i> .....	53
12.1.2.	<i>Método</i> .....	55
12.1.3.	<i>Criterios de Aceptación</i> .....	59
12.2.	EXACTITUD .....	62
12.2.1.	<i>Definición</i> .....	62
12.2.2.	<i>Método</i> .....	62
12.2.3.	<i>Criterios de aceptación</i> .....	63
12.3.	PRECISIÓN.....	66
12.3.1.	DEFINICIÓN .....	66
12.3.2.	MÉTODO .....	67
12.3.3.	CRITERIOS DE ACEPTACIÓN .....	69
•	REPETIBILIDAD .....	69
•	REPRODUCIBILIDAD.....	70
12.4.	RECOBRO .....	72
12.4.1.	DEFINICIÓN .....	72
12.4.2.	MÉTODO .....	73
12.4.3.	CRITERIO DE ACEPTACIÓN .....	75
12.5.	LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN.....	77
12.5.1.	DEFINICIÓN .....	77
12.5.2.	MÉTODO .....	77
12.5.3.	CRITERIOS DE ACEPTACIÓN .....	78
12.6.	LINEALIDAD Y CURVA DE CALIBRACIÓN.....	80
12.6.1.	<i>Definición</i> .....	80
12.6.2.	<i>Método</i> .....	81
12.6.3.	<i>Criterios de Aceptación</i> .....	84
12.7.	ESTABILIDAD.....	88
12.7.1.	DEFINICIÓN .....	88
12.7.2.	MÉTODO .....	89
12.7.3.	CRITERIOS DE ACEPTACIÓN.....	98
<b>13.</b>	<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>101</b>
<b>14.</b>	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>110</b>
<b>15.</b>	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>111</b>

## I. Índice de Tablas

Tabla 1. Comparación de publicaciones relacionadas a la revisión de la regulación para validación de bio-métodos cromatográficos.....	17
Tabla 2. Cronología de las regulaciones con impacto significativo en Bioanálisis. ....	22
Tabla 3. Selectividad.....	61
Tabla 4. Exactitud.....	65
Tabla 5. Precisión.....	71
Tabla 6. Recobro.....	76
Tabla 7. Límite Inferior de Cuantificación.....	79
Tabla 8. Linealidad/Curva de calibración.....	87
Tabla 9. Estabilidad.....	100

## II. Índice de Figuras

Figura 1. Validación de Métodos Bioanalíticos.....	13
Figura 2. Proceso General de Preparación de Muestras.....	26
Figura 3. Etapas de Análisis Bioanalíticos.....	32
Figura 4. Panorama General de Preparación de Muestras Biológicas.....	44
Figura 5. Selectividad.....	47
Figura 6. Representación de Precisión y Exactitud.....	48
Figura 7. Límite Inferior de Cuantificación.....	49
Figura 8. Linealidad/Curva de Calibración.....	49
Figura 9. Estabilidad.....	50
Figura 10. Efecto de la Matriz.....	50
Figura 11. Recobro.....	51

### III. Abreviaturas

% CV	Coeficiente de variación en por ciento
%Desv.	Por ciento de Desviación
°C	Grados Centígrados
µg	Microgramos
µg/mL	Microgramos por mililitro
µL	Microlitros
µm	Micrómetros
AAPS	Asociación Americana de Científicos Farmacéuticos
AAS	Ácido Acetilsalicílico
ABC	Área bajo la curva
ACN	Acetonitrilo
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ANVISA	Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria (Brasil)
AUC	Área bajo la curva
b	Ordenada al origen
BCS	Sistema de Clasificación Biofarmacéutica
BE	Bioequivalencia
BPL	Buenas Prácticas de Laboratorio
C.V.	Coeficiente de Variación
CAT	Modelo Predictivo de Absorción y Transito compartimental
C <sub>máx</sub>	Concentración Máxima
COFEPRIS	Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (México)
CV	Coeficiente de Variación
D.E.	Desviación Estándar
D.E.A.	Desviación Estándar Absoluta
Da	Daltons
DE	Desviación Estándar
DER	Desviación Estándar Relativa
E.E.U.U.	Estado Unidos de América
ECD	Ciclos de Congelación-Descongelación
ELA	Extracción en línea de fase solida en linea
ELISA	Ensayo de Inmuno Absorción Enzimática de Hibridación Competitiva
ELP	Estabilidad a Largo Plazo
EMA	Agencia Europea de Medicinas (Unión Europea)
EMP	Estabilidad Muestra Procesada en refrigeración
EMP	Estabilidad Muestra Procesada
EMPA	Estabilidad Muestra Procesada en Automuestreador

ES	Estabilidad en Sangre
ETA	Estabilidad a Temperatura Ambiente
FA	Ácido Fórmico
FD	Factor de dilución
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos (Estados Unidos)
FEUM	Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos
FID	Ionización de Llama
FMN	Factor Matriz Normalizado
g	Gramos
g/mol	Gramos por mol
GC	Cromatografía de Gases
h	Horas
HClO <sub>4</sub>	Ácido Hidroperclórico
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Resolución
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Resolución
INT	Solución Intermedia
IS	Estándar interno
ISR	Análisis de Muestras Incurridas
L	Litros
LC-MS/MS	Cromatografía Líquida acoplado a espectrometría de masas masas
LIC	Límite Inferior de Cuantificación
LL	Extracción Líquido-Líquido
LSC	Límite Superior de Cuantificación
m	Pendiente
M	Solución Molar
MC	Muestras Control
MCA	Muestra Control Alta
MCB	Muestra Control Baja
MCD	Muestra Control Diluida
MCM-1	Muestra Control Media 1
MeCN	Acetonitrilo
MeOH	Metanol
mg	Miligramos
mg/mL	Miligramos por mililitro
MHLW	Ministerio de Salud, Trabajo y Bienestar (Japón)
min	Minutos
mL	Mililitro
mL	Mililitros
mL/min	Mililitros por minuto
mm	Milímetro



mM	Milimolar
mol	Mol
MRM	Multiple reaction monitoring (Monitorización de reacción múltiple)
MTA BCO	Muestra Blanco
MTA CERO	Muestra Cero
N	Solución Normal
NDA	Aplicación de Nuevos Medicamentos
ng/mL	Nanogramos por mililitro
NH <sub>4</sub> OH	Hidróxido de Amonio
NIST	Instituto Nacional para Estándares y Tecnología
NOM	Norma Oficial Mexicana
PD	Estudios Farmacodinámicos
pH	Potencial de Hidrógeno
PI	Investigador Principal
PK	Estudios Farmacocinéticos
PNO	Procedimiento Normalizado de Operación
PP	Extracción Precipitación de Proteínas
psi	Pounds per square inch (libra-fuerza por pulgada cuadrada)
r	Coeficiente de correlación
r <sup>2</sup>	Coeficiente de determinación
rpm	Revolución por minuto
S.A de C.V.	Sociedad Anónima de Capital Variable
S.A.	Sociedad Anónima
SPE	Extracción en Fase Sólida
SRM	Material Estándar de Referencia
SSA	Secretaria de Salud
STD	Estándar de la curva de calibración en matriz biológica
STD	Estándares de Calibración
TFA	Ácido Trifluoroacético
T <sub>máx</sub>	Tiempo en que se alcanza la C <sub>máx</sub>
UPLC	Cromatografía Líquida de Ultra Rápida Resolución
UPLC-MS/MS	Cromatografía de Líquidos de Ultra Eficacia acoplado a Masas-
USP	Farmacopea de los Estados Unidos (USP, por sus siglas en inglés)
USP	Farmacopea de los Estados Unidos Americanos
Uv-Vis	Ultravioleta Visible
V	Volts
ZnS	Sulfato de Zinc

#### IV. RESUMEN

La validación de un método analítico en fluidos biológicos asegura que el desarrollo del método es reproducible, estable, sensible, robusto, adecuado y confiable para su aplicación en sangre, plasma, suero, orina y heces. La validación de métodos bioanalíticos asegura la alta calidad de los datos para el sometimiento de los resultados a las entidades regulatorias para el desarrollo y descubrimiento de nuevos fármacos.

La regulación del bioanálisis ha tenido muchas raíces. En esencia, todos están diseñados para mostrar que el método y, por lo tanto, los datos que se generan son sólidos y confiables para su propósito previsto. Puede haber muchas formas de lograr esto y durante más de dos décadas, los reguladores han respondido a las observaciones observadas en el campo y dentro de las filtraciones farmacéuticas, mientras que la comunidad científica ha implementado nuevas tecnologías y ha buscado formas de demostrar su validez.

Un reto para los científicos bioanalíticos de Cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas (LC-MS / MS) al trabajar a través de las regulaciones de varios países es la comprensión de la terminología. Al igual que cualquier área de nueva ciencia, los científicos que participan en validaciones y bioanálisis regulados comenzaron sin necesidad de cálculos exhaustivos y claros, cada uno con sus propias perspectivas sobre lo que se necesitaba para cumplir datos científicamente sólidos y de calidad.

En la actualidad cada país o región con sus propias regulaciones Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios, México (COFEPRIS), Administración de Medicamentos y Alimentos, Estados Unidos (FDA, por sus siglas en inglés), Agencia Europea de Medicinas, Unión Europea (EMA, por sus siglas en inglés), Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria, Brasil (ANVISA, por sus siglas en inglés), Ministerio de Salud Trabajo y Bienestar, Japón (MHLW, por sus siglas en

inlges) establece para la validación de métodos bioanalíticos tres rubros principales que son: definiciones, métodos y criterios de aceptación.

En el presente trabajo se abordan los tres rubros de cada uno de los parámetros de validación de un método bioanalítico cromatográfico que se encuentran vigentes en la legislación nacional e internacional. Se revisa la forma aplicar y cumplir con cada una de las guías de manera simultánea complementándose entre ellas para someter resultados de validaciones y estudios en diferentes regiones del mundo o un país en específico.

## 1. INTRODUCCIÓN

La validación de un método analítico en fluidos biológicos asegura que el desarrollo del método es reproducible, estable, sensible, robusto, adecuado y confiable para su aplicación en sangre, plasma, suero, orina y heces. ([Kadian, Raju et al. 2016](#))

En el caso de la validación del método bioanalítico abarca todos los procedimientos que demuestran que un método particular utilizado para la medición cuantitativa de analitos en una matriz biológica dada es, confiable y reproducible para el uso previsto, ([Lawrence X. Yu, 2014](#)) por ejemplo en estudios de Bioequivalencia, Farmacocinética y Toxicocinética.

La validación de métodos bioanalíticos asegura la alta calidad de los datos para el sometimiento de los resultados a las entidades regulatorias para el desarrollo y descubrimiento de nuevos fármacos. ([Kadian, Raju et al. 2016](#))

Aunque existe un entendimiento general entre las diferentes entidades regulatorias del mundo sobre la evaluación de los parámetros de validación existen aún algunas diferencias en las metodologías y criterios de aceptación empleados para la validación de métodos bioanalíticos. Estas variaciones son importantes y marcan la pauta para el sometimiento de estudios a las entidades regulatorias de una región o específicamente de un país. ([Kadian, Raju et al. 2016](#))

En el presente trabajo se abordan las definiciones, métodos y criterios de aceptación de cada uno de los parámetros de validación de un método bioanalítico cromatográfico que se encuentran vigentes en la legislación nacional e internacional. Se revisará la forma aplicar y cumplir con cada una de las guías de manera simultánea complementándose entre ellas para someter resultados de validaciones y estudios en diferentes regiones del mundo o un país en específico.

## 2. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad cada país o región con sus propias regulaciones (COFEPRIS (México), FDA (Estados Unidos), EMA (Unión Europea), ANVISA (Brasil), MHLW (Japón)) establece para la validación de métodos bioanalíticos tres rubros principales que son: definiciones, métodos y criterios de aceptación.

Existe la necesidad de analizar y proponer estos rubros de manera incluyente, sin la intención de unificar, pero sí de abarcar los requisitos de las entidades regulatorias más importantes del mundo, de tal manera que los laboratorios (Terceros Autorizados y Centros de Investigación Clínica) puedan proponer soluciones inmediatas a los requerimientos de los Patrocinadores con base en el tipo de estudio y a la región o regiones en donde se aplicará el mismo.

Si existen diferencias entre las diferentes guías de las regulaciones Nacionales e Internacionales y entre ellas pueden complementarse entonces se podrá establecer una propuesta que incluya a todas las regulaciones citadas, de tal manera que la validación y ejecución de un estudio bioanalítico pueda ser sometido a cada región o país específico sin la necesidad de hacer cambios en las metodologías.

Como resultado final la Población de una región o país específico, podrá tener acceso a los medicamentos evaluados con los requisitos apropiados de cada país o región de manera expedita y con los estándares de calidad exigidos. En la figura 1 presenta el panorama general de las guías nacionales e internacionales y su aplicación en métodos Bioanalíticos cromatográficos.

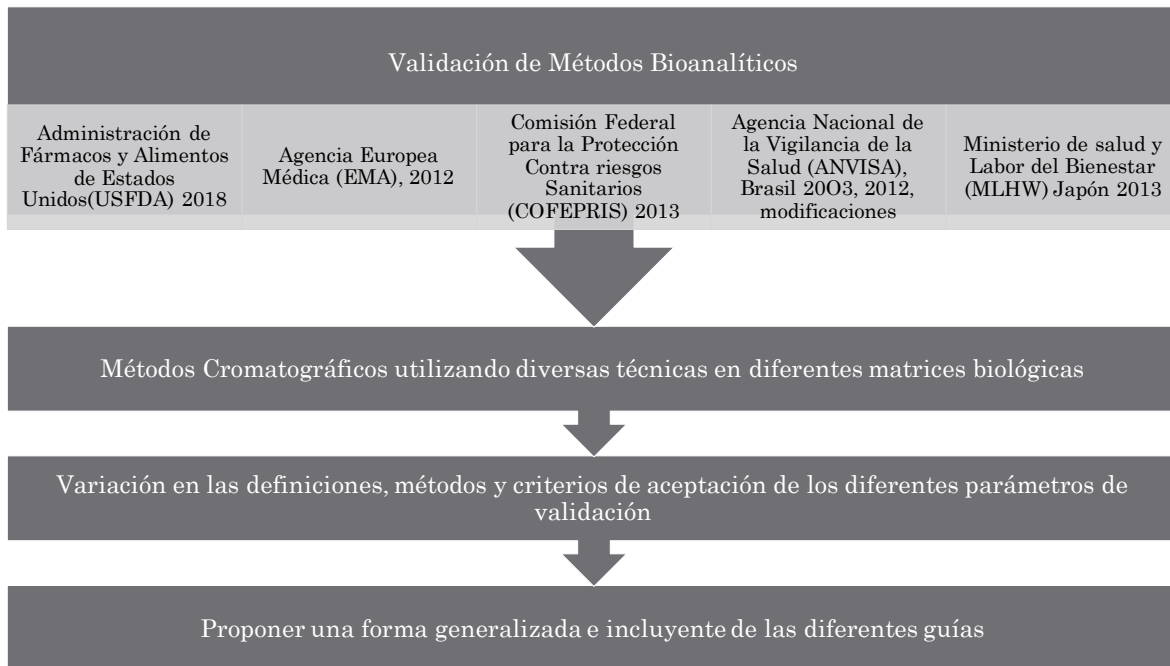


Figura 1. Validación de Métodos Bioanalíticos

### 3. TIPO DE INVESTIGACIÓN

No experimental.

Investigación documental.

#### 4. ANTECEDENTES

Los estándares de validación entre cada una de las legislaciones son muy similares son embargo existen ciertas diferencias conceptuales, metodológicas y de criterios de aceptación entre ellas y que marcan la pauta para la revisión de estas diferencias. En la revisión se compara y resumen las pautas normativas emitidas por la Administración de Medicamentos y Alimentos, Estados Unidos (FDA, por sus siglas en ingles), Agencia Europea de Medicinas, Unión Europea (EMA, por sus siglas en ingles), Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria, Brasil (ANVISA, por sus siglas en ingles) para la validación del método bioanalítico. Esta revisión también analiza la evaluación de ciertos parámetros de validación tales como efecto matriz, re-análisis de muestras incurridas, diversos aspectos de estabilidad, efecto de contra-iones anticoagulantes, especificidad en presencia de medicamentos concomitantes e identificación de repeticiones farmacocinéticas en las que se brinda orientación específica ya que no existe consenso general entre la comunidad científica, en éste trabajo se menciona la Estabilidad en Sangre Total y específicamente sobre el efecto de las muestras lipémicas y hemolizadas. ([Kollipara, Bende et al. 2011](#))

Sonawane en 2014 publicó un artículo de revisión de la aplicación de métodos bioanalíticos y su aplicación en la industria. El trabajo se centró en la evaluación consistente de los principales parámetros de validación bioanalítica: precisión, exactitud, sensibilidad, selectividad, curva estándar, límites de cuantificación, rango, recuperación y estabilidad. Se describen estos parámetros de validación, junto con un ejemplo de metodología de validación aplicada en el caso de los métodos cromatográficos utilizados en el bioanálisis, teniendo en cuenta las directrices recientes de la FDA y las directrices EMA, menciona específicamente recomendaciones para la evaluación de la reproducibilidad intermedia y menciona la diferencia entre selectividad y especificidad. ([V Sonawane, 2014](#))

En el año 2014, la Asociación Americana de Científicos Farmaceuticos (AAPS) público un trabajo sobre la aplicación e implementación de la Guia de FDA 2013 (Borrador), lo que resalta de ésta revisión es la definición de validación parcial, validación cruzada,



Corridas analíticas de varios lotes y el reporte del desarrollo del método, la reintegración manual de cromatogramas, presentando la integración original y la modificada. ([Booth, Arnold et al. 2015](#))

En el año 2016 Tijare y colaboradores, publicaron un artículo de revisión enfocado en el desarrollo y validación de métodos bioanalíticos desde el punto de vista del departamento de Aseguramiento de Calidad. ([Tijare, Nt et al. 2016](#)). En el año 2016 Kadian y colaboradores, publicaron un artículo donde destacan las variaciones, similitudes y comparación entre las directrices de validación del método bioanalítico emitidas por las principales autoridades reguladoras en todo el mundo. Además, incluyen otros parámetros de evaluación como el efecto de la matriz, la muestra incurrida, reanálisis. Además, discuten otros aspectos de estabilidad para proporcionar una facilidad de acceso al diseñar un método bioanalítico y su validación para que cumplan con la mayoría de las directrices de la autoridad. ([Kadian, Raju et al. 2016](#))

En contraste, la presente revisión hace un análisis integral de las guías más importantes del mundo presentando las siguientes características que los anteriores trabajos citados no incluyen:

1. Se menciona la guía más actual de la FDA: validación del método bioanalítico, Guía para la industria 2018.
2. Se incluye la Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013 que establece:
  - a) las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable, incluyendo:
  - b) requisitos a los cuales deben sujetarse los Terceros Autorizados que realicen las pruebas de intercambiabilidad,
  - c) requisitos para realizar los estudios de biocomparabilidad,
  - d) requisitos a los cuales deben sujetarse los Terceros Autorizados, Centros de Investigación o Instituciones Hospitalarias que realicen las pruebas de biocomparabilidad.
3. Se analizan las definiciones, metodologías y criterios de aceptación para cada parámetro de validación y se proponen estrategias para cumplir con todas las guías de manera simultánea.

Tabla 1. Comparación de publicaciones relacionadas a la revisión de la regulación para validación de bio-métodos cromatográficos.

Autor	Publicación	Aportaciones
Kollipara 2011	International guidelines for bioanalytical method validation: A comparison and discussion on current scenario	<ul style="list-style-type: none"> <li>• FDA de EE. UU. 2001 Publicó directrices base de directrices como ANVISA y EMA</li> <li>• Se compara y resume FDA de EE. UU., ANVISA y EMA</li> <li>• Analiza efecto matriz, reanálisis de muestras incurridas, diversos aspectos de estabilidad, efecto de contraiones, anticoagulantes, especificidad en presencia de medicamentos concomitantes.</li> </ul>
Sonawane 2014	Pharmaceutica Bioanalytical Method Validation and Its Pharmaceutical Application- A Review	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Se centró, precisión, exactitud, sensibilidad, selectividad, curva estándar, límites de cuantificación, rango, recuperación y estabilidad.</li> <li>• Se describen estos parámetros de validación, junto con un ejemplo de metodología de validación aplicada en el caso de los métodos cromatográficos utilizados en el bioanálisis,</li> <li>• FDA EMA.</li> <li>• Reproducibilidad intermedia, diferencia entre selectividad y especificidad</li> </ul>
Booth 2014	White Paper Workshop Report : Crystal City V — Quantitative Bioanalytical Method Validation and Implementation : The 2013 Revised FDA Guidance	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Aplicación e implementación de la Guía de FDA 2013 (Borrador)</li> <li>• Validación Parcial, Validación Cruzada, Corridas analíticas de varios lotes y el reporte del desarrollo del método, la re-integración manual de cromatogramas.</li> </ul>
Tijare 2016	A review on bioanalytical method development and validation by RP-HPLC	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Revisión de desarrollo y validación de métodos bioanalíticos desde el punto de vista del departamento de Aseguramiento de Calidad</li> </ul>
Kadian 2016	Comparative assessment of bioanalytical method validation guidelines for pharmaceutical industry	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Variaciones, similitudes y comparación entre las directrices de validación del método bioanalítico emitidas por las principales autoridades reguladoras en todo el mundo.</li> <li>• Además, otros parámetros de evaluación como el efecto de la matriz, la muestra incurrida reanálisis incluyendo otros aspectos de estabilidad se han discutido para proporcionar una facilidad de acceso para diseñar un método bioanalítico y su validación que cumpla con la mayoría de las directrices de la autoridad.</li> </ul>

## 5. VALIDACIÓN

### 5.1. Antecedentes históricos

La validación es un concepto que ha evolucionado en Estados Unidos desde 1978. El concepto de validación se ha extendido a través de los años para abarcar una amplia gama de actividades desde métodos analíticos utilizados para el control de calidad de sustancias farmacológicas y productos farmacéuticos, hasta sistemas computarizados para ensayos clínicos. ([Kaur Harpreet and Rayat, 2013](#))

La palabra validación simplemente significa evaluación de validez o acción para probar la efectividad. ([Keyur B. Ahir, 2014](#))

Éste atributo (validación) incorpora que existen las siguientes las siguientes condiciones: calidad, seguridad y eficacia en un producto, ([Keyur B. Ahir, 2014](#)) servicio o proceso. La calidad no puede garantizarse de manera adecuada simplemente mediante la inspección o prueba de productos terminados o en proceso. Cada paso de un proceso de fabricación debe ser controlado para garantizar que el producto terminado cumpla con todos los atributos de calidad y las incluidas las especificaciones. ([Kaur Harpreet and Rayat, 2013](#))

El concepto de validación fue propuesto por primera vez por dos funcionarios de la FDA, Ted Byers y Bud Loftus, a mediados de la década de 1970 con el fin de mejorar la calidad de los productos farmacéuticos. Fue propuesto en respuesta directa a varios problemas en la esterilidad del mercado parenteral de gran volumen. Las primeras actividades de validación se centraron en los procesos involucrados en la fabricación de estos productos, pero se extendieron rápidamente al proceso asociado de productos farmacéuticos. ([Keyur B. Ahir, 2014](#))

## 5.2. Definición

A continuación, se define el concepto de validación desde diferentes perspectivas. ([WHO 1996](#), [Robert A. Nash 2003](#), [COFEPRIS 2013](#), [Keyur B. Ahir 2014](#))

### *Comisión Europea*

1991-Acto de Probar en concordancia con las buenas prácticas de manufactura que un proceso conduce a los resultados esperados.

2000-Evidencia documentada de que el proceso, operado dentro de los Parámetros establecidos, puede funcionar de manera efectiva y reproducible para producir un producto medicinal que cumpla con sus especificaciones predeterminadas y atributos de calidad

### *FDA, Estados Unidos*

La validación del proceso es establecer evidencia documentada que proporciona un alto grado de seguridad de que un proceso específico producirá consistentemente un producto que cumpla con sus especificaciones predeterminadas y características de calidad.

### *ICH*

La validación del proceso es establecer evidencia documentada que proporciona un alto grado de seguridad de que un proceso específico producirá consistentemente un producto que cumpla con sus especificaciones predeterminadas y características de calidad.

### *OMS*

El acto documentado de probar que cualquier procedimiento, proceso, equipo, material, actividad o sistema en realidad conduce al resultado esperado.

### *COFEPRIS, México*

A la evidencia documental generada a través de la recopilación y evaluación científica de los datos obtenidos en la calificación y de las pruebas específicas, a lo largo del todo el ciclo de vida de un producto, cuya finalidad es demostrar la funcionalidad,

consistencia y robustez de un proceso dado en cuanto a su capacidad para entregar un producto de calidad.

### 5.3. Legislación Nacional e Internacional para Validación de Métodos Bioanalíticos Cromatográficos.

Se han adoptado directrices o procedimientos específicos para ayudar al químico y dirigirlo hacia las aplicaciones prácticas durante la creación de un nuevo método analítico, que incluye medidas de verificación y evaluación externa. ([Q. Alan X, 2013](#))

Se espera que los datos bioanalíticos que se envían a las autoridades de salud mundial en el soporte de aplicaciones de aprobación de medicamentos cumplan con ciertos estándares y requisitos regulatorios. La validación del análisis bioanalítico y la realización del análisis de muestras de estudio se aborda con una gran cantidad de documentos de orientación normativa. ([Lowes, 2017](#))

Las autoridades sanitarias, encargadas de garantizar la salud pública, promulgan reglamentos, guías y pautas cuando ven deficiencias en el desarrollo de nuevos fármacos o durante las inspecciones de las instalaciones que realizan el trabajo para estos desarrollos. Las regulaciones recientemente introducidas han variado de menores a dramáticas, y muchas han tenido un impacto significativo en las prácticas de la industria farmacéutica. En muchos casos, las nuevas reglamentaciones abordan las deficiencias observadas en las prácticas en empresas individuales, pero, no obstante, se extrapolan y aplican ampliamente; por lo tanto, muchos pagan por los errores de unos pocos. En la última década, se ha producido una expansión constante no solo de la amplitud de los temas que se están reglamentando, sino también del número de países que desarrollan sus propios requisitos. Debido a este complejo y a veces conflictivo conjunto de reglas, la industria farmacéutica ha respondido con organizaciones regionales y consorcios multirregionales que proporcionan comentarios en un intento por armonizar las prácticas. ([Lowes, 2017](#))

Sin embargo, los esfuerzos por unificar criterios, metodologías y en ocasiones conceptos no han rendido frutos, ya que cada país o región adoptan las medidas

regulatorias que se apegan a sus necesidades. Es por ello conveniente hacer un análisis de las guías más importantes y diseñar las metodologías, experimentos, criterios y conceptos para que, de manera simultánea se cumplan con las diferentes directrices al momento de validar o aplicar un análisis de muestras. Con ello se facilitará el sometimiento de resultados de estudios Bioanalíticos a diferentes regulaciones al mismo tiempo, sin la necesidad de hacer más ajustes o rediseñar las pruebas de validación, de tal manera que los tiempos y costos pueden verse reducidos y al mismo tiempo se garantiza la calidad de los datos que se verán impactados durante la inserción al mercado de nuevos productos farmacéuticos con la seguridad, eficacia y a un costo accesible para la población.

Es importante resaltar que, aunque hay diferencias en algunos parámetros del desempeño de la validación todas las guías comparten similitudes que hacen que entre ellas se complementen. Dicho esto, todos los documentos de orientación requieren la demostración de los siguientes atributos del método fundamental dentro de ciertos criterios (a menos que se justifique lo contrario en el método y la documentación de validación):([Lowes, 2017](#))

- Selectividad
- Exactitud
- Precisión
- Sensibilidad
- Linealidad
- Estabilidad
- Efecto Matriz
- Reproducibilidad

Estos conceptos serán explicados en el numeral 12 Parámetros de Validación: Definiciones, Métodos y Criterios de Aceptación.

En la tabla 2, se presenta la cronología de las Guías que han tenido un impacto significativo en la regulación histórica del Bioanálisis.

Tabla 2. Cronología de las regulaciones con impacto significativo en Bioanálisis.

Año	Contribución o Impacto
1972	Dinamarca y Nueva Zelanda introducen las buenas prácticas de laboratorio.
1978	Estados Unidos, Implementación de las buenas prácticas de laboratorio, con base en la identificación de registros fraudulentos encontrados por inspectores de la FDA en el año de 1977.
1992	Canadá: Salud de Canadá, guía para la industria, conducción y análisis de estudios de biodisponibilidad y bioequivalencia- Parte A, formulaciones de dosificación oral utilizadas para efectos sistémicos.
1997	Estados Unidos: FDA CFR 21 Parte 11, registros electrónicos y firmas electrónicas.
1997	Japón: Ordenanza ministerial sobre los estándares para la realización de estudios no clínicos sobre la seguridad de los medicamentos (Ministerio de Salud y Bienestar, Ordenanza No. 21, 26 de marzo de 1997)
1998	Internacional: OECD, Principios de las buenas prácticas de laboratorio y monitoreos de cumplimiento.
2001	Estados Unidos: FDA, Guía para la industria: Validación de Métodos Bioanalíticos
2003	Estados Unidos: FDA, Estudios de biodisponibilidad y bioequivalencia para productos farmacéuticos administrados por vía oral: consideraciones generales
2003	Brasil: Resolución No. 899 Guía para la validación de métodos analíticos y bioanalíticos.
2005	Brasil: Revisión de la regulación de ANVISA 2003.
2005	India: Ministerio de salud y familia: Guías para estudios de biodisponibilidad y bioequivalencia

Año	Contribución o Impacto
2005	Internacional: ICH Q2 (R1), Validación de procedimientos analíticos, texto y metodología.
2005	China: CFDA, Guía técnica para biodisponibilidad humana y estudios de bioequivalencia para medicamentos de origen químico.
2009	Internacional: OMS, Buenas prácticas de laboratorio clínico.
2010	Unión Europea: EMA, Directrices sobre la investigación de la bioequivalencia.
2011	China: CFDA (2011), Orientación sobre la gestión del laboratorio para el análisis de muestras biológicas de los ensayos clínicos de medicamentos.
2011	Unión Europea, EMA, Guía sobre la validación de métodos bioanalíticos.
2012	Brasil, ANVISA, Resolución RDC 27, requisitos mínimos para la validación del método bioanalítico utilizado en estudios con el propósito de registro y renovación de registro de medicamentos.
2012	Canadá, HPBF, Conducción y análisis de estudios comparativos de Bioequivalencia.
2012	Unión Europea: EMA, Documento de reflexión para laboratorios que realizan el análisis o la evaluación de muestras de ensayos clínicos
2013	Japón, MHLW, Guía sobre la validación del método bioanalítico en el desarrollo farmacéutico
2014	Japón, MHLW, Guía sobre la validación del método bioanalítico (ensayo de unión al ligando) en el desarrollo farmacéutico
2013	Estados Unidos, FDA Borrador, Guía para la industria, Validación del método bioanalítico
2013	México Cofepris. Establece de manera clara la estabilidad en solución de los analitos y estándares internos así como la evaluación de la estabilidad de los isotopos radiomarcados.
2015	Unión Europea, EMA, proporciona una guía para los revisores que destaca la ausencia del proceso de certificación de laboratorio de la FDA de Estados Unidos para los estudios de buenas prácticas de laboratorios.



Año	Contribución o Impacto
2015	Canadá: Requiere pruebas de estabilidad para usar 3 muestras separadas derivadas de contenedores separados, a diferencia de 3 muestras de un solo contenedor de almacenamiento
2018	Estado Unidos FDA, Inclusión del análisis de muestras programado, incluye los criterios para la validación de métodos cromatográficos y ensayos de unión de ligandos.

## 6. BIOANÁLISIS

### 6.1. Antecedentes históricos

La historia del bioanálisis está directamente relacionada con el desarrollo de la ciencia de la farmacología y con el campo de la farmacocinética. El bioanálisis práctico está relacionado con el desarrollo de metodología analítica e instrumentación para apoyar las necesidades de datos de estos campos. ([Lowes, 2017](#))

En 1847, durante una presentación a la Sociedad Filosófica de Glasgow, Andrew Buchanan MD., postuló que "el éter solo actúa como un narcótico después de ser absorbido, y que la energía de su acción es proporcional al grado en que la sangre se aplica a los tejidos del corazón y el cerebro está impregnado de ella". Esta presentación es una de las primeras instancias informadas que relaciona la concentración sanguínea con una acción farmacológica observada, aunque hace casi 170 años no se contaban con la tecnología para confirmar la hipótesis de Buchanan. ([Lowes, 2017](#))

Uno de los tópicos más importante en la historia del Bioanálisis es la preparación de las muestras ya que la preparación de la muestra es necesaria para hacer una muestra biológica adecuada compatible con el método seleccionado para la cuantificación de productos farmacéuticos, biomarcadores, o metabolitos. Para llevar a cabo esta tarea, el científico bioanalítico debe entender la química del analito.

así como la matriz y la tecnología de detección, si el método de detección necesario para alcanzar los requisitos de sensibilidad, selectividad y el rendimiento no son compatibles con los componentes de la matriz, el científico debe separar el analito de las interferencias durante preparación de la muestra. La mayoría de las muestras bioanalíticas colectadas para la determinación de productos farmacéuticos, metabolitos, y biomarcadores están en matrices biológicas que contienen una gran cantidad de proteínas. Suero sanguíneo y plasma. Antes de realizar un bioanálisis utilizando cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) o cromatografía de gases

(GC), la muestra debe ser compatible con GC o HPLC. En concreto, la cantidad de proteínas. debe reducirse a un nivel tolerable antes de la inyección sin afectar la capacidad de cuantificar con precisión al analito Las proteínas generalmente no son compatibles con las técnicas de HPLC, no son volátiles, interfieren con la mayoría de los detectores y contribuyen a la supresión de iones para los ensayos de LC-MSMS. En la figura 2, se presenta un diagrama con el método general de análisis para la preparación de muestras. ([Chang, Ji et al. 2007](#))

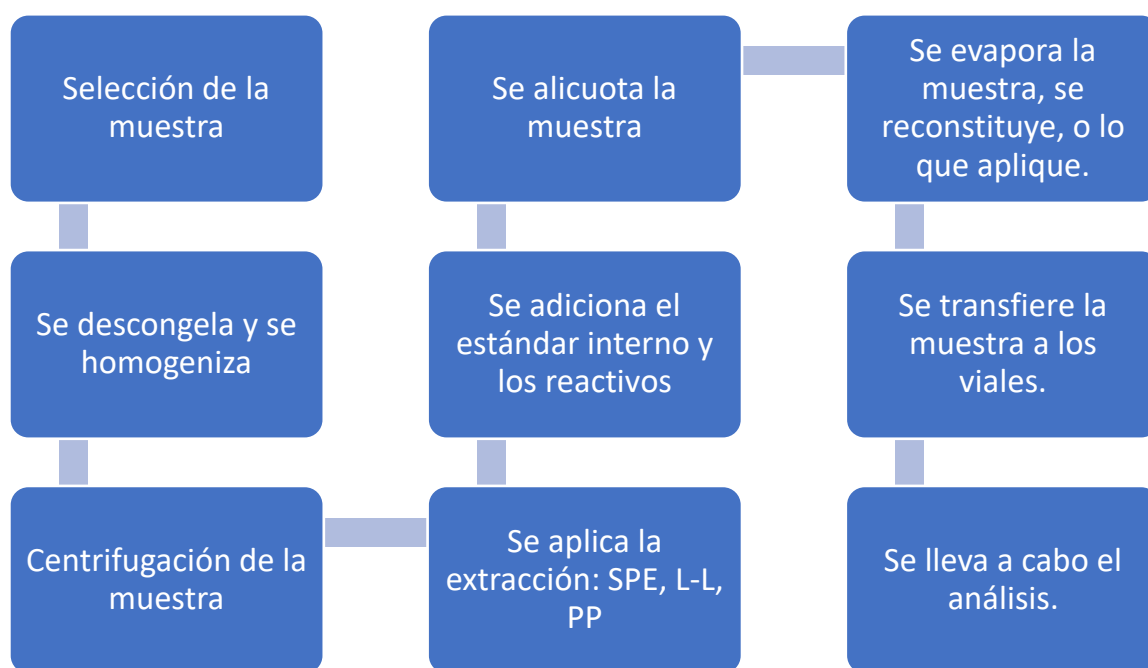


Figura 2. Proceso General de Preparación de Muestras

## 6.2. Definición

El bioanálisis, simplemente se puede describir como la medición cuantitativa de la concentración de un fármaco, su(s) metabolito(s), o un compuesto endógeno presente en una matriz biológica y que es esencial para el descubrimiento, desarrollo y aprobación regulatoria de nuevos medicamentos.

### 6.3. Importancia del Bioanálisis

El Bioanálisis es clave para la farmacocinética moderna (es decir, el estudio de lo que el cuerpo le hace a un fármaco) y, cada vez más, para la farmacodinamia (es decir, el estudio de lo que un fármaco le hace al cuerpo). Comprender estos procesos biológicos es fundamental para determinar los perfiles de seguridad de los fármacos y los potenciales de eficacia, así como para establecer la dosis recomendada para los nuevos tratamientos terapéuticos que tratan la enfermedad.

La generación de estos datos es importante para obtener medicamentos seguros y efectivos para los pacientes. Es el ingenio del equipo de bioanálisis que permite el desarrollo de ensayos robustos para cumplir con los requisitos de sensibilidad y selectividad en una amplia gama de entidades químicas, desde fármacos de moléculas pequeñas hasta terapias basadas en proteínas o Ácido Desoxirribonucleico (ADN).([Lowes, 2017](#))

Los analitos de interés para el bioanálisis cuantitativo varían desde las pequeñas moléculas con pesos moleculares menores a 1,000 Da (por ejemplo los farmacoquímicos y sus metabolitos), hasta biopolímeros grandes como las proteínas. ([Q. Alan X, 2013](#))

En este trabajo nos enfocaremos a las moléculas ya que para los fines de este trabajo se enfatiza en la Bioequivalencia, Farmacocinética y Toxicocinética. Además para las moléculas grandes como proteínas se requieren otro tipo de estudios no basta con los cromatográficos, en este trabajo se tratan los aspectos de validación para métodos cromatográficos.

### 6.4. Métodos Bioanalíticos

#### 6.4.1. Métodos colorimétricos

Los métodos colorimétricos fueron el enfoque más temprano utilizado para el bioanálisis. Estos métodos se basan en la formación de un complejo coloreado entre el analito objetivo y un reactivo. De acuerdo con la Ley de Beer, la concentración del

analito es directamente proporcional a la absorbancia del complejo coloreado, por lo tanto, la concentración puede determinarse en función de la intensidad del complejo coloreado determinado mediante un colorímetro. La especificidad de los métodos colorimétricos depende del número de sustancias presentes en la muestra que pueden formar el complejo coloreado con el reactivo elegido. Un ejemplo de uno de estos métodos es el "Sistema de análisis de sangre" descrito por Folin y Wu, 1919, para la determinación de nitrógeno no proteico, urea, creatinina, creatina, ácido úrico y azúcar en la sangre. Vale la pena señalar que tales métodos colorimétricos no se limitaron a componentes endógenos, un punto ejemplificado por las publicaciones de Haggard y Shaffer en 1923 que describen métodos para la determinación de éter dietílico en sangre. Un problema importante con tales métodos colorimétricos es la falta de especificidad. Cualquier compuesto que reaccione con el reactivo colorimétrico para formar un complejo dará un resultado positivo. En otras palabras, el grado de formación de color, y por lo tanto la concentración de analito, depende de la concentración total de todos los analitos en la muestra capaz de reaccionar con el reactivo. Durante las décadas de 1940 y 1950, la falta de especificidad se abordó mediante descubrimientos de investigación en dos áreas: cromatografía e inmunoensayo. Las obras en ambos campos fueron objeto del premio nobel, A.J.P. Martin recibió un Premio Nobel por su investigación en cromatografía en 1952, y Rosalyn Yalow recibió un premio Nobel en 1977 por su investigación en el área de radioinmunoanálisis. ([Lowes, 2017](#))

#### 6.4.2. Métodos cromatográficos

Los métodos cromatográficos mejoraron la especificidad del ensayo al agregar una "dimensión" de separación antes de la detección del analito. Los primeros métodos bioanalíticos basados en la cromatografía utilizaron la cromatografía de gases (GC) para la separación, antes de un detector no específico como un detector de ionización de llama (FID). Se podría obtener una especificidad adicional para los ensayos cromatográficos utilizando un detector específico de masa, es decir, un espectrómetro

de masas. Un requisito previo para la aplicación de GC es la necesidad de que el analito sea volátil, lo que limita la aplicación directa de analitos separados por GC para la detección. Para superar este requisito, los investigadores desarrollaron métodos novedosos para derivatizar analitos a especies volátiles.

En estos métodos, el analito generalmente se extrae primero de la matriz y luego se trata con un reactivo que reacciona con un grupo funcional en el analito para formar una especie volátil. El exceso de reactivo se elimina de la muestra y la muestra se inyecta en un cromatógrafo de gases usando condiciones que separan el analito de los otros componentes en la muestra. El analito derivatizado se detecta posteriormente utilizando un detector universal (por ejemplo, FID) o un detector específico tal como un detector de captura de electrones, un detector de GC de nitrógeno - fósforo o un espectrómetro de masas; el último tiene la ventaja de que puede confirmar la integridad estructural del analito derivatizado. La aplicabilidad limitada de los métodos basados en GC contribuyó a la rápida adopción, durante la década de 1970, de métodos bioanalíticos basados en la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), que elimina el requisito de que un analito sea volátil. A diferencia de GC, la principal limitación de los primeros métodos de HPLC fue la sensibilidad. El enfoque de detección de HPLC más comúnmente empleado en los primeros métodos se basó en la espectrometría ultravioleta / visible (UV / Vis). Por lo tanto, la sensibilidad dependía directamente del coeficiente de extinción del analito a la longitud de onda de detección empleada. Con el fin de abordar este problema de sensibilidad, los investigadores desarrollaron enfoques de derivatización para introducir cromóforos a los analitos. Otros métodos de detección basados, por ejemplo, en fluorescencia o electroquímica también se emplearon. El problema de sensibilidad para la HPLC se abordó en gran parte cuando se introdujo la interfaz de HPLC / espectrometría de masas a presión atmosférica a principios de la década de 1990. Hoy en día, LC-MS es la plataforma analítica más comúnmente utilizada para el bioanálisis de moléculas pequeñas. El cambio de los métodos bioanalíticos basados en GC a los métodos de LC-MS es ilustrado por los sujetos de las presentaciones en el Reid International Bioanalytical Forum, que se realiza cada 2 años desde su inicio en 1975. Según la revisión de

Stevenson ([WHO, 1996](#)), durante los primeros tres en las reuniones, el número de presentaciones que describen la metodología basada en GC excedió en número a las que describen los métodos de HPLC en una proporción de 2: 1. Durante las décadas de 1980 y 1990, esta relación se desplazó gradualmente para favorecer los ensayos de HPLC. Los métodos HPLC-MS comenzaron a predominar en 1997, y desde entonces la mayoría de las presentaciones de metodología en esta conferencia han sido basadas en HPLC-MS. La metodología basada en inmunoensayos se desarrolló en paralelo a los métodos cromatográficos durante los años ochenta y noventa. La especificidad del radioinmunoensayo se basó inicialmente en la interacción tridireccional entre el analito, el analito radioactivo y un anticuerpo contra el analito. La desventaja de tales métodos, sin embargo, era la necesidad de reactivos apropiados; es decir, un anticuerpo específico para el analito en cuestión, así como también el analito marcado sobre el cual se basa la detección. La ventaja de dichos métodos, especialmente los que utilizan detección de radiactividad, es el grado potencialmente alto de sensibilidad que tales métodos permiten. Durante los años setenta y principios de los ochenta, los métodos basados en inmunoensayos cumplieron, al menos en parte, la brecha de sensibilidad experimentada con los ensayos cromatográficos. Como resultado, muchas nuevas aplicaciones de medicamentos (NDA) durante este período emplearon métodos bioanalíticos basados en inmunoensayos. Por ejemplo, los NDA para enalapril y lisinopril, dos de los fármacos prescritos más comúnmente para la hipertensión, se apoyaron por completo con inmunoensayos. En la actualidad, la metodología basada en LC-MS ha eliminado en gran medida la necesidad de desarrollar métodos de inmunoensayo para apoyar el bioanálisis de moléculas pequeñas (típicamente menos de 1000 g/mol de peso molecular). Por otro lado, los métodos de inmunoensayo todavía se emplean ampliamente para la medición de proteínas y péptidos en fluidos biológicos. ([Lowes, 2017](#))

#### 6.4.2.1. Etapas del bioanálisis mediante LC-MS/MS

Hay tres etapas principales del proceso de bioanálisis regulado mediante cromatografía líquida-espectrometría de masas en tandem (LC-MS / MS): desarrollo de métodos, validación de métodos y análisis de muestras, incluido la reanálisis de muestras incurridas (ISR, por sus siglas en inglés). Los métodos robustos de LC-MS / MS son esenciales para el descubrimiento de fármacos, estudios de toxicología y ensayos clínicos. El desarrollo de un método bioanalítico robusto requiere una cuidadosa consideración de muchos parámetros críticos, tales como exactitud y precisión, linealidad, efecto de matriz, sensibilidad, selectividad, estabilidad, rendimiento y robustez (o reproducibilidad). Debido a que los datos bioanalíticos son críticos para determinar la seguridad y eficacia de un nuevo medicamento, un método bioanalítico debe validarse siguiendo las directrices ([Q. Alan X, 2013](#)) de las normativas vigentes, las recomendaciones de artículos y procedimientos normalizados de operación (PNO). Una validación completa del método regulado en la matriz biológica requiere mínimamente 3 corridas diarias de precisión y precisión, varias evaluaciones a corto y largo plazo y estabilidad de la matriz, recuperación de la extracción, capacidad de dilución y linealidad, estabilidad del extracto, reproducibilidad de la reinyección, selectividad y especificidad. Evaluación de los efectos de la matriz, interferencia de medicamentos concomitantes y profármaco/metabolitos, etc. La evaluación definitiva de cualquier método bioanalítico de alta calidad no está completa hasta que supera la última prueba del análisis de muestras reguladas y el re-análisis de muestras incurridas (ISR) que también se realiza siguiendo las reglas similares a la validación. ([Q. Alan X, 2013](#)). En la figura 3 se muestran las etapas de análisis de un estudio bioanalítico.



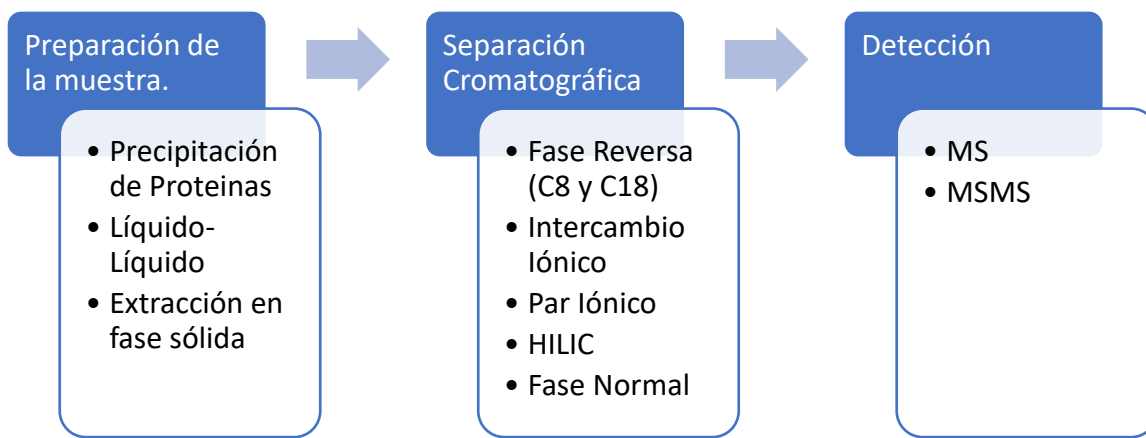


Figura 3. Etapas de Análisis Bioanalíticos

## 7. BIOEQUIVALENCIA

### 7.1. Definición

La bioequivalencia (BE) se define como: la ausencia de una diferencia significativa en la tasa y el grado en que el ingrediente activo o resto activo en equivalentes farmacéuticos o alternativas farmacéuticas, está disponible en el sitio de acción del fármaco cuando se administra a la misma dosis molar en condiciones similares en un estudio diseñado apropiadamente. Los medicamentos se consideran equivalentes farmacéuticos si contienen el (los) mismo (s) ingrediente (s) activo (s), son de la misma forma de dosificación, vía de administración, son idénticos en concentración o en fuerza y cumplen con los mismos estándares u otros estándares aplicables (es decir, concentración, calidad, pureza e identidad). Los productos farmacéuticos se consideran alternativas farmacéuticas si contienen el mismo resto terapéutico, pero son sal, ésteres o complejos diferentes de ese resto, o son formas de dosificación o puntos fuertes diferentes. ([Lawrence X. Yu, 2014](#))

### 7.2. Estudios de bioequivalencia

Los estudios de bioequivalencia son un componente principal en la evaluación de la equivalencia terapéutica mediante la verificación de que el ingrediente activo del medicamento de prueba se absorberá en el cuerpo en la misma medida y al mismo ritmo que el producto de referencia del medicamento de referencia.

La importancia de este estudio es que cuando se muestra que dos productos farmacéuticamente equivalentes son bioequivalentes, se considera que los dos productos son terapéuticamente equivalentes.

Se espera que los productos terapéuticamente equivalentes tengan los mismos perfiles de seguridad y eficacia, cuando se administran bajo las condiciones enumeradas en el etiquetado del producto.

Para los medicamentos genéricos, los estudios de bioequivalencia confirman la equivalencia clínica entre los productos genéricos y de referencia. Para los medicamentos nuevos, estos estudios verifican la equivalencia clínica entre diferentes formulaciones y, a veces, entre diferentes puntos fuertes. Como tal, la bioequivalencia es una parte integral del desarrollo y las normas tanto para los medicamentos genéricos como para los nuevos.

La bioequivalencia se divide a través de la historia en tres periodos, los años 1970-1980, los años 1990 y los 2000.

Las décadas de 1970 y 1980 fueron cuando se estableció por primera vez la bioequivalencia con un papel importante en el desarrollo y la regulación de medicamentos. La década de 1990 marcó una intensa discusión sobre el concepto de bioequivalencia individual, así como sobre el desarrollo del Sistema de clasificación biofarmacéutica (BCS, por sus siglas en inglés) y sus aplicaciones posteriores a guías normativas. Esta era también contó con el desarrollo del modelo predictivo de absorción y tránsito compartimental (CAT, por sus siglas en inglés). El cambio de milenios (2000s) vio el desarrollo del Sistema de clasificación de disposición de fármacos biofarmacéuticos (BDDCS, por sus siglas en inglés), la evolución de los estándares BE para fármacos altamente variables, la implementación del área parcial bajo la curva, la creación de enfoques novedosos para índices terapéuticos estrechos de medicamentos, y el desarrollo de una serie de enfoques BE para medicamentos de acción local. ([Lawrence X. Yu, 2014](#))

### 7.2.1. Regulación

Las regulaciones de bioequivalencia de FDA 1977 desempeñaron un papel importante en el establecimiento de la Competencia de precios de medicamentos de 1984 y la Ley de restauración de términos de patentes, informalmente conocida como la "Ley Hatch-Waxman". Esta ley supone que la bioequivalencia es un sustituto eficaz de la seguridad y la eficacia. Estableció el sistema moderno de medicamentos genéricos

donde los productos farmacéuticos deben ser terapéuticamente equivalentes al cumplir los siguientes criterios generales (FDA Orange Book 2013):

1. Los productos están aprobados como seguros y efectivos.
2. Los productos son equivalentes farmacéuticos porque (a) contienen cantidades idénticas del mismo ingrediente activo en la misma forma de dosificación y vía de administración y (b) cumplen con estándares mencionados en la farmacopea u otros estándares aplicables de solidez, calidad, pureza e identidad.
3. Los productos son bioequivalentes porque (a) no presentan un problema de bioequivalencia conocido o potencial, y cumplen con un estándar aceptable *in vitro*, o (b) si presentan un problema conocido o potencial, se demuestra que se encuentran un estándar de bioequivalencia apropiado.
4. Los productos están etiquetados adecuadamente.
5. Los productos se fabrican de conformidad con las normas actuales de buenas prácticas de fabricación.

Al cumplir con estos requisitos, se espera que los productos genéricos tengan el mismo efecto clínico y perfil de seguridad cuando se administren a pacientes en las condiciones especificadas en el etiquetado (FDA 2013a).

#### 7.2.2. Métodos para demostrar la bioequivalencia

El refinamiento continuo de la ciencia *in vivo* e *in vitro* ha llevado a la FDA a revisar los métodos para demostrar la bioequivalencia. A la fecha de publicación, los métodos actuales utilizados para cumplir con el requisito legal de bioequivalencia incluyen (FDA 2003a):

1. Estudios farmacocinéticos (PK)
2. Estudios farmacodinámicos (PD)
3. Ensayos clínicos comparativos
4. Estudios *in vitro*

La selección del tipo de estudios de bioequivalencia que se realizarán se basa en el sitio de acción del medicamento y la capacidad del diseño del estudio para comparar la administración del medicamento. ([Lawrence X. Yu, 2014](#))

## 8. FARMACOCINÉTICA

Una aplicación importante de los datos bioanalíticos es su uso para dilucidar la farmacocinética de una molécula. La palabra farmacocinética se deriva de las palabras griegas pharmakon, que significa drogas y venenos, y la palabra cinética, que se refiere al cambio de una o más variables en función del tiempo.

El objetivo de la farmacocinética es estudiar el curso temporal de las concentraciones o cantidades de fármaco o metabolito en matrices biológicas y construir modelos adecuados para interpretar dichos datos. El término apareció por primera vez en 1953 en una publicación de Dost.

A continuación, se presentan algunos términos farmacocinéticos básicos derivados de datos bioanalíticos, junto con sus definiciones.

Área bajo la curva: área integrada bajo la curva de concentración plasmática-tiempo de la molécula entre los tiempos  $t_1$  y  $t_2$  (Nota: dependiendo de la molécula, el suero o las concentraciones de sangre total del fármaco se pueden evaluar a lo largo del tiempo, a diferencia de las concentraciones plasmáticas. Este parámetro está representado matemáticamente por la ecuación  $\int_{t_1}^{t_2} C dt$ . El término es típicamente abreviado  $AUC_{t_1-t_2}$  y se expresa en unidades de  $(\mu\text{g/L}) \cdot \text{h}$  o  $\mu\text{M} \cdot \text{h}$

Vida media: tiempo requerido para que las concentraciones plasmáticas del fármaco disminuyan a la mitad. La semivida de eliminación generalmente se refiere a la vida media observada en la porción terminal de la curva de concentración-tiempo. El término se abrevia típicamente  $t_{1/2}$ .

Concentración máxima: la concentración plasmática máxima de fármaco observada después de su administración. Esto es típicamente abreviado  $C_{\text{máx}}$ .

Tiempo de concentración máxima: el tiempo después de la administración del fármaco al que se alcanza  $C_{\text{máx}}$ . Este término es típicamente abreviado  $T_{\text{máx}}$ .

Volumen de distribución: el volumen aparente en el cuerpo en el que se distribuye un fármaco. Típicamente abreviado  $V_d$ , este valor se calcula como la dosis,  $D$ , dividida por la concentración del fármaco en  $T = 0$ ,  $C_0$ . Debido a que el volumen de sangre en humanos es de aproximadamente 5 L, un volumen de distribución significativamente mayor a 5 L indica que el compuesto probablemente se distribuye en el espacio extravascular.

Depuración del plasma: Volumen de plasma depurado de la droga por unidad de tiempo. Este valor se calcula dividiendo la dosis sistémicamente disponible por el AUC total extrapolado al tiempo infinito.

Dos términos clave adicionales que son de particular relevancia para el bioanálisis regulado son la biodisponibilidad y la bioequivalencia.

Biodisponibilidad: Típicamente simbolizado por una  $f$  minúscula, la biodisponibilidad se refiere a la fracción de una dosis de fármaco que alcanza la circulación sistémica y generalmente se caracteriza como relativa ( $f_{rel}$ ) o absoluta ( $f_{abs}$ ).

La *biodisponibilidad relativa* se refiere a una comparación de, o proporción de, fármaco disponible sistémicamente después de la administración de dosis equivalentes de dos formas de dosificación diferentes, generalmente orales. Este valor se calcula tomando la relación de las AUC obtenidas después de administrar las dos formas de dosificación diferentes.

La *biodisponibilidad absoluta* se refiere a la comparación de la cantidad de fármaco sistémicamente disponible después de su administración a través de una ruta donde el fármaco debe ser absorbido (generalmente por vía oral) y se compara con la administración intravenosa. ([Lowes, 2017](#))

Y por último la Bioequivalencia, concepto que se abordó en el punto 7.

## 9. TOXICOCINÉTICA

La guía EMA del 2012 que habla sobre VMB, que se encuentra entre las guías más exhaustivas, indica que es aplicable a "estudios toxicocinéticos en animales y todas las fases de ensayos clínicos".

Por lo tanto, en la práctica, las empresas a menudo inician la primera validación del método bioanalítico en un candidato a fármaco en preparación para el primer estudio de toxicología, que normalmente es bastante anterior a cualquier presentación regulatoria o ensayo clínico. Con posterioridad a estos primeros estudios en toxicología humana habilitantes, la VMB en la matriz humana se lleva a cabo en preparación para el estudio FIH. En general, se realiza una VMB "completa" en el fármaco original y en los principales metabolitos en cada especie y matriz utilizada durante la realización de estudios regulados. ([Lowes, 2017](#))

Los estudios de evaluación de la seguridad de los medicamentos regulados en las buenas prácticas de laboratorio (BPL) son una parte importante de las actividades de desarrollo preclínico. En un estudio de toxicología típico, la evaluación toxicocinética se realiza con el fin de determinar la exposición adecuada al fármaco en los animales del estudio. ([Lowes, 2017](#))

## 10. DESARROLLO DE MÉTODOS Y VALIDACIÓN

Como ya se mencionó anteriormente, hay tres etapas principales del proceso de bioanálisis regulado mediante cromatografía líquida-espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS): 1) desarrollo de métodos, 2) validación de métodos y 3) análisis de muestras, incluido el reanálisis de muestras incurridas (ISR).

Los métodos robustos y de alto rendimiento de LC-MS /MS son esenciales para el descubrimiento de fármacos, estudios de toxicología y ensayos clínicos. El desarrollo de un método bioanalítico robusto requiere una cuidadosa consideración de muchos parámetros críticos, tales como exactitud y precisión, linealidad, efecto de matriz, sensibilidad, selectividad, estabilidad, rendimiento y robustez (o reproducibilidad).

Debido a que los datos bioanalíticos son críticos para determinar la seguridad y eficacia de un nuevo medicamento, se debe validar un método bioanalítico siguiendo las directrices de las normas nacionales e internacionales para la industria, las recomendaciones de varios libros y procedimientos normalizados de operación (PNO). Una validación completa del método regulado en la matriz biológica requiere mínimamente 3 corridas diarias de precisión y exactitud, varias evaluaciones a corto y largo plazo y estabilidad de la matriz, recuperación de la extracción, capacidad de dilución y linealidad, estabilidad del extracto, reproducibilidad de la reinyección, selectividad y especificidad, evaluación del efecto de la matriz, interferencia de medicamentos concomitantes y profármaco / metabolitos, etc.

La evaluación definitiva de cualquier método bioanalítico de alta calidad no está completa hasta que supera la última prueba del análisis de muestras reguladas y el reanálisis de muestras incurridas (ISR) que también son llevado a cabo siguiendo las reglas similares a la validación. ([Q. Alan X, 2013](#))

Las técnicas utilizadas con mayor frecuencia en los estudios bioanalíticos son la cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas en tándem (LC-MS / MS) y el ensayo de inmuno absorción enzimática de hibridación no competitiva (ELISA).

Tradicionalmente, la ELISA es una técnica muy útil para productos biofarmacéuticos y biomarcadores como proteínas y oligonucleótidos, mientras que la LC-MS/MS es más



adecuada para moléculas pequeñas por lo que en este trabajo nos enfocaremos a la técnica de LC-MS/MS como el estándar de oro para el desarrollo y validación de métodos bioanalíticos para fármacos.

Las matrices biológicas comunes para el bioanálisis son diversos tejidos, fluidos corporales, sangre total, plasma, suero y orina. Más recientemente, la muestra de sangre seca como matriz alternativa ha ganado popularidad en la industria. Antes del análisis de LC-MS / MS, las muestras biológicas deben extraerse de matrices biológicas mediante diversos procedimientos de limpieza. Actualmente, las técnicas de extracción más utilizadas son la extracción por precipitación de proteínas (PP), la extracción líquido-líquido (LL) y la extracción en fase sólida (SPE). Además, varias técnicas de extracción novedosas, es decir, extracción con líquido asistido (ELA), extracción en línea de fase sólida (EFS en línea), eliminación de fosfolípidos EFS / PP también son técnicas que se han desarrollado([Q. Alan X, 2013](#))

#### 10.1. Precipitación de proteínas (PP)

La precipitación de proteínas es el método de extracción más comúnmente utilizado. En principio, el mecanismo subyacente de la precipitación de proteínas es disminuir la solubilidad de los analitos mediante la adición de solvente orgánico como metanol (MeOH) o acetonitrilo (MeCN) o sal tamponada saturada como sulfato de zinc 10 M (ZnS 4) o alta concentración de ácido fuerte o base tal como 5-10 % de ácido trifluoroacético (TFA) o ácido hidroperclórico (HClO<sub>4</sub>).

En la aplicación LC-MS / MS, debido a la incompatibilidad de alta sal o ácido fuerte o base con MS fuente, el enfoque más común es agregar solvente orgánico a una proporción mínima de 1:3 (v / v) de solvente orgánico de matriz. Si el fármaco activo está altamente unido a la proteína, se utiliza un ácido volátil o una base tal como ácido fórmico (FA) o hidróxido de amonio (NH<sub>4</sub>OH) respectivamente al 5-10 % para interrumpir la unión aumentando así la recuperación del fármaco.

Históricamente, la PP se ha realizado en tubos. En los últimos años, la PP en formato de 96 pozos como la placa de precipitación PP comercial ha ganado popularidad para

aumentar el rendimiento. El PPE en tubos es económico y confiable, pero requiere transferencia manual/pipeteo, mezcla de vórtice y centrifugación.

En PP en formato de 96 pocillos, las 96 muestras pueden transferirse simultáneamente, lo que aumenta tremendamente el rendimiento. Debido a que el volumen de transferencia entre las muestras es el mismo y se programa de antemano, garantiza una recuperación constante, mejorando así el rendimiento general del ensayo. ([Q. Alan X, 2013](#))

## 10.2. Extracción líquido-líquido (LL) y extracción con líquido asistido (ELA)

Aunque la PP es la técnica de extracción más eficiente y económica, también es el procedimiento de extracción más inespecífico que se sabe que es susceptible al efecto de matriz para el ensayo LC-MS / MS. Por el contrario, ELL proporciona un extracto mucho más limpio. LLA, también conocido como extracción y división de disolventes, separa los analitos en función de su solubilidad relativa en dos disolventes inmiscibles diferentes, generalmente agua y un disolvente orgánico. Los disolventes utilizados más comúnmente para ELL son acetato de etilo, metil-ter-butil-éter, cloruro de metileno y hexano o la combinación de los disolventes anteriores.

Con el fin de manipular la polaridad de los analitos, a menudo se utiliza un ácido volátil o base tal como Ácido Fórmico o Hidróxido de Amonio, respectivamente, al 5-10%. LL para el bioanálisis generalmente se realiza en tubos. La transferencia se puede lograr mediante pipeteo o congelación de vertido. Para el enfoque de congelación, los tubos se combinan en acetona o baño de hielo seco con metanol durante aproximadamente 1 minuto, la capa acuosa que normalmente se encuentra en la capa inferior se congela, por lo que la capa orgánica superior se puede verter fácilmente.

LL también se puede llevar a cabo en formato de placa de 96 pocillos en el que la extracción se logró mezclando mediante robots de automatización a través de puntas de pipeta de 30 a 40 veces. Este enfoque de extracción es libre de trabajo y eficiente. Sin embargo, es menos contundente que mediante la mezcla con agitador o vortexer. Por lo tanto, la recuperación es normalmente más baja que la extracción de tubo. En

los últimos años, la extracción con líquido soportado (ELA) se ha fusionado y se ha vuelto cada vez más popular. La placa comercial SLE consta de 96 pocillos individuales, cada uno de ellos empacado con una forma patentada y modificada que tiene una alta capacidad para retener muestras acuosas. Cuando la muestra de plasma se carga en el pozo de extracción, los analitos se absorben sobre la superficie del soporte en una capa muy delgada.

A diferencia del LLE manual en el que las emulsiones podrían causar problemas, en la extracción de SLE, la emulsión se elimina por completo para la muestra y el disolvente de extracción inmiscible en agua nunca está en contacto directo. También elimina todos los pasos manuales, como tapado, mezclado, centrifugado y decantación, lo que reduce en gran medida la contaminación. Debido a que todos los pasos de procedimiento se pueden automatizar por completo, ELA es tan eficiente como usar placas de PP pero proporciona extractos mucho más limpios. La única desventaja para ELA es el volumen de alícuotas de muestra limitado (<400 mL) para mantener en formato de placa de 96 pocillos.

### 10.3. Extracción en fase sólida (SPE) en línea y fuera de línea.

Otra técnica de extracción popular y selectiva ampliamente utilizada en el bioanálisis es la extracción en fase sólida (SPE). SPE es un proceso de separación que utiliza la afinidad de los analitos a una fase estacionaria sólida. Al manipular la polaridad y el pH de la fase móvil, los analitos de interés o impurezas indeseadas pasan a través de la fase estacionaria secuencialmente de acuerdo con sus propiedades físicas y químicas.

Para un procedimiento de SPE, una etapa de lavado se refiere a la elución de las impurezas no deseadas que se descartan y la etapa de elución se refiere a la elución de los analitos de interés que se recogen. Si bien lo fundamental sigue siendo el mismo en décadas, la continua invención e introducción de nuevas fases estacionarias comerciales y dispositivos accesorios han impulsado la aplicación de SPE en el bioanálisis y en muchos otros campos. SPE inicialmente viene en la forma de un

cartucho empaquetado en forma de jeringa para extracción manual, y luego seguido por una placa de 96 pocillos, cada una de las cuales puede montarse en su tipo específico de colector de extracción.

La primera generación de fases estacionarias de SPE estaba hecha de una cadena principal de sílice unida a una cadena de hidrocarburo de longitud variable tal como C18, C8 y fenilo. La segunda generación de fases estacionarias SPE todavía estaba principalmente hecha de columna vertebral de sílice, pero con más modificación para estos grupos funcionales. Además de cadenas hidrocarbonadas de longitud variable (para SPE de fase inversa), se introdujeron grupos amino o amonio cuaternario (para intercambio aniónico) y grupos ácido sulfónico o carboxilo (para intercambio catiónico) para extracción en modo de mezcla con selectividad de extracción aumentada. La tercera generación de fases estacionarias de SPE se hizo a partir de sorbentes poliméricos hidrófobos, pero humectables en agua.

Otra técnica de preparación de muestras avanzada y novedosa es la extracción en línea de fase sólida (SPE en línea). Aunque el mecanismo de extracción es el mismo que el de la SPE tradicional, el SPE en línea ofrece varias ventajas. Debido a que la preparación de la muestra se lleva a cabo durante el análisis, elimina el tiempo necesario para la preparación de la muestra y, por lo tanto, aumenta el rendimiento de manera significativa. Además, debido a que la muestra completa se eluye al sistema LC-MS / MS, puede aumentar la sensibilidad del ensayo. Finalmente, dado que no hay extracción manual, puede reducir el error humano, la posible contaminación y la recuperación inconsistente. ([Q. Alan X, 2013](#)). En la figura 4 se presenta el panorama general de la preparación de muestras biológicas.

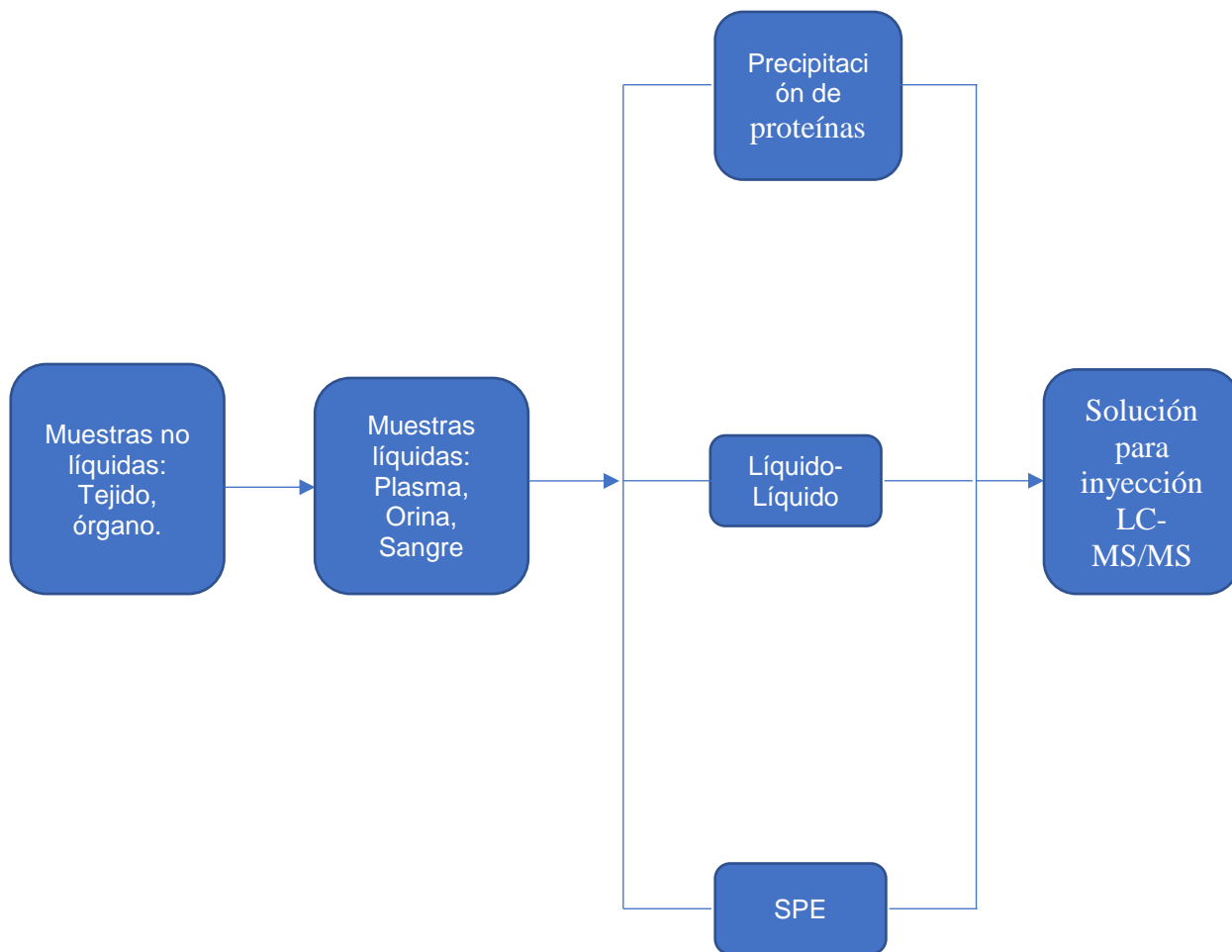


Figura 4. Panorama General de Preparación de Muestras Biológicas

#### 10.4. Requisitos de una validación

La validación del método regulado debe realizarse de acuerdo con un Procedimiento Normalizado de Operación, que generalmente se redacta siguiendo las directrices de las regulaciones aplicables para la validación de bioanálisis regulado.

Los procedimientos normalizados de operación describen varias pruebas de validación para verificar que un método sea confiable y reproducible utilizando estándares de calibración (STD) y muestras de control de calidad (MC).

Para la Validación de un método Bioanalítico formal, se asigna un Investigador principal (PI) o Director del estudio para garantizar que las pruebas de validación cumplen los criterios de aceptación y son adecuadas para el análisis de las muestras del estudio. Un protocolo de estudio debe escribirse y aprobarse a priori para iniciar la validación en el cual se debe incluir los experimentos, materiales de referencia y rango (s) de curva de calibración y pruebas estadísticas que se utilizarán. ([Q. Alan X, 2013](#))

Los elementos básicos para iniciar y conducir la validación de un método bioanalítico son:

### *Matrices*

Un ensayo debe validarse utilizando la misma matriz biológica que las muestras del estudio. Si una matriz tiene disponibilidad limitada, se puede usar un sustituto adecuado (por ejemplo, un ultrafiltrado de plasma para sustituir el fluido cerebroespinal) para la preparación de los estándares de calibración. Cuando se necesita una solución de adición para preparar estándares y los puntos control de calidad en la matriz, el volumen de adición debe ser inferior al 5% del volumen total de la matriz. ([Lowes, 2017](#))

### Soluciones Stock

Se usan dos soluciones madre preparadas y verificadas individualmente para preparar estándares de calibración y muestras control de calidad, respectivamente. Algunos laboratorios requieren que la estabilidad de la solución madre se establezca antes de la validación formal. Pero algunos requieren establecer al menos un punto de tiempo durante la validación para cubrir el tiempo de las soluciones utilizadas durante la validación. ([Lowes, 2017](#))

## Modelo de Regresión

El modelo más simple que describe adecuadamente la relación concentración-respuesta debe ser utilizado, por ejemplo, un modelo lineal es más simple que un modelo cuadrático. Al finalizar la validación, se debe realizar la evaluación de diferentes modelos de regresión. La justificación para usar una ecuación de regresión cuadrática debe estar documentada. ([Lowes, 2017](#))

## Concentraciones de los estándares y puntos control de calidad

Regularmente, se deben usar de seis a ocho concentraciones distintas de cero que cubran el rango dinámico del ensayo para definir la curva. Dos estándares de calibración deben estar en concentraciones más bajas que la muestra de la muestra control baja y dos estándares de calibración deben estar en concentraciones por encima de la muestra de la muestra control alto. Se recomiendan cinco niveles de control de calidad analítico, es decir, límite inferior de cuantificación (LIC), muestra, muestra control bajo (3 veces LIC), control medio extra (medio geométrico), muestra control medio (40 al 60 % del límite superior de cuantificación) y muestra control alto (75 al 85 % del límite superior de cuantificación). ([Lowes, 2017](#))

## 11. INTRODUCCIÓN A LOS PARÁMETROS DE VALIDACIÓN: DEFINICIONES, MÉTODOS Y CRITERIOS DE ACEPTACIÓN

En esta sección se abordan las características de los parámetros de validación que se enuncian en las diferentes guías Nacionales e Internacionales desde un punto de vista no particular a una guía específica, en la sección 12 se ahondará en cada parámetro desde el punto de vista de cada guía particular y se analizarán la comparación de las guías.

### 11.1. Selectividad.

La capacidad del método para medir el analito en presencia de otros componentes de la muestra. (Ver figura 5)

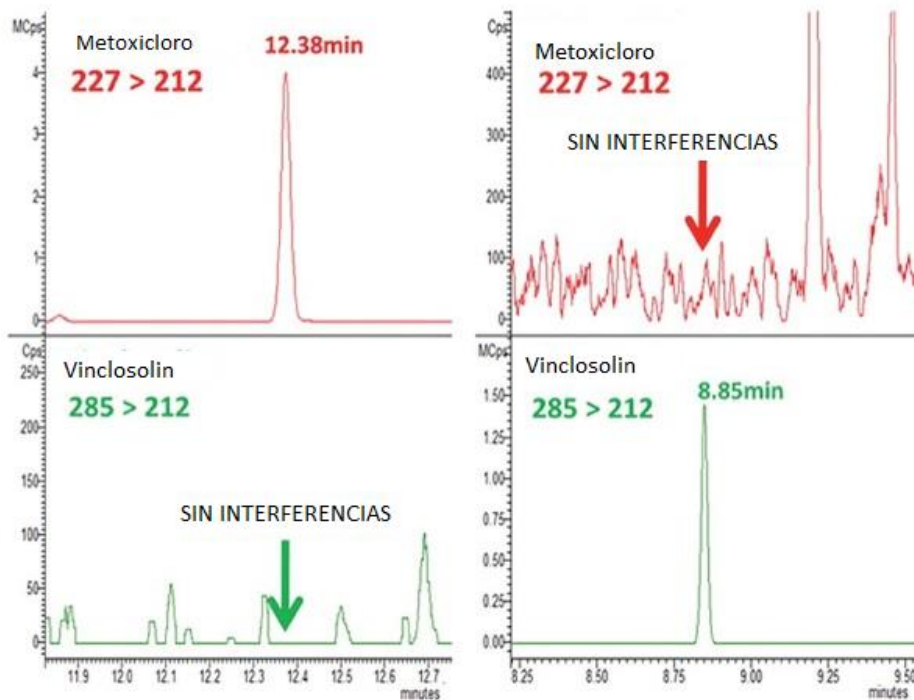


Figura 5. Selectividad



11.2. Exactitud.

La cercanía de los resultados de la prueba desde el método hasta el valor verdadero (o nominal) (concentración). (Ver figura 6)

11.3. Precisión.

La variabilidad entre los resultados de pruebas individuales determinada en mediciones repetidas. (Ver figura 6)

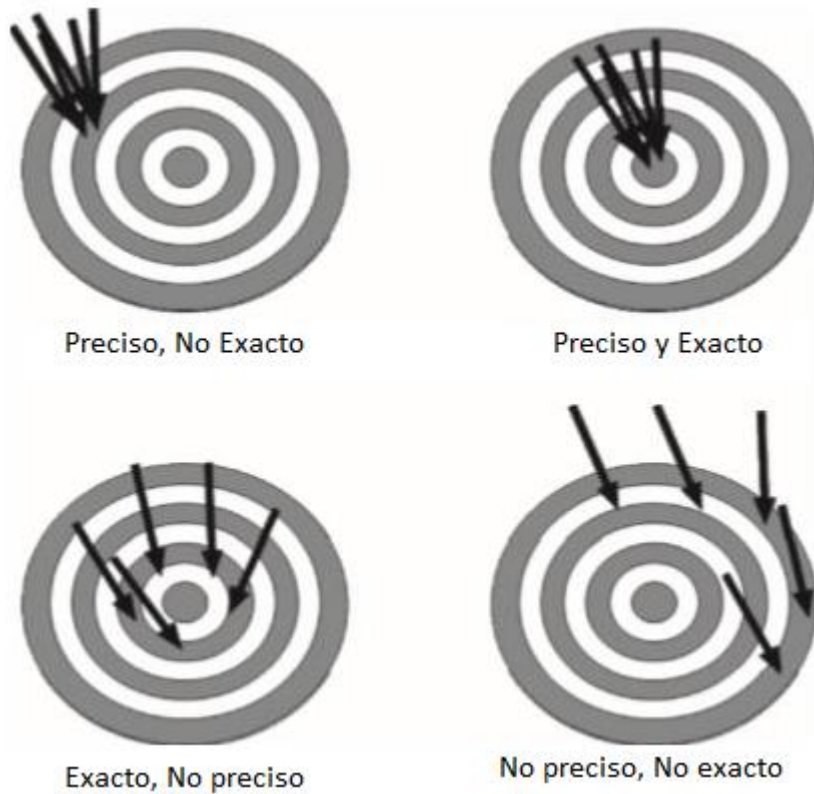


Figura 6. Representación de Precisión y Exactitud

#### 11.4. Sensibilidad o límite inferior de cuantificación (LIC).

La concentración más baja de analito que puede cuantificarse de manera confiable. (Ver Figura 7)

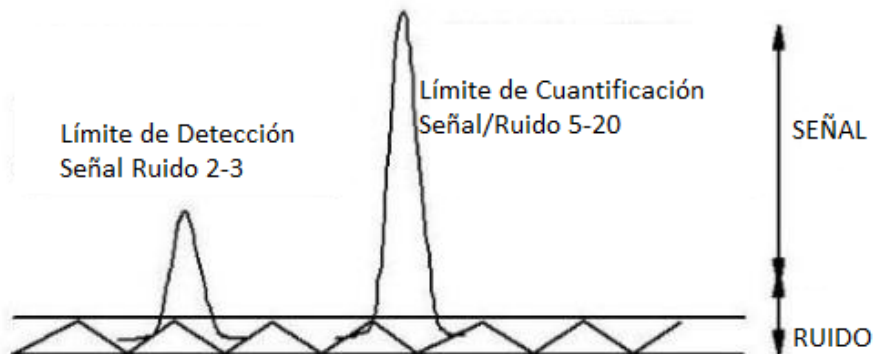


Figura 7. Límite Inferior de Cuantificación

#### 11.5. Curva de calibración (Linealidad).

La relación entre la concentración del analito y la respuesta del instrumento (también conocida como Curva estándar). (Ver figura 8)

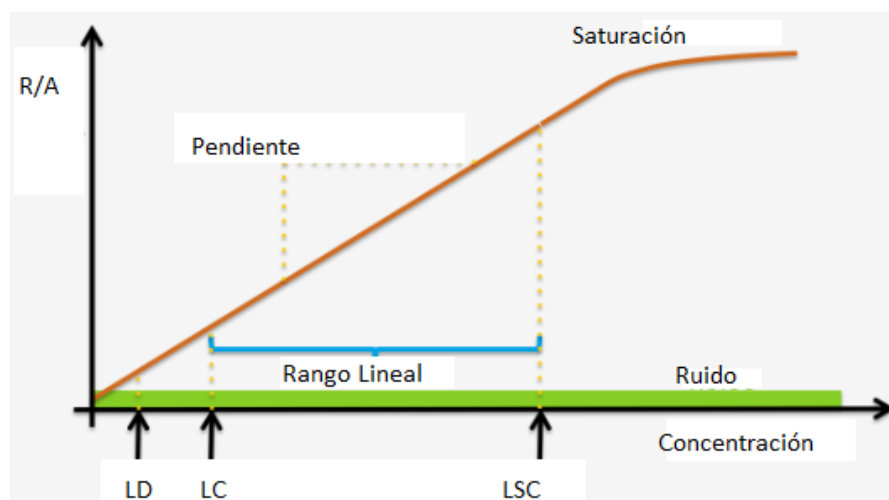


Figura 8. Linealidad/Curva de Calibración

## 11.6. Estabilidad.

La estabilidad del analito en las matrices, contenedores y condiciones utilizados para la recolección, el almacenamiento y el análisis de muestras. (Ver figura 9)

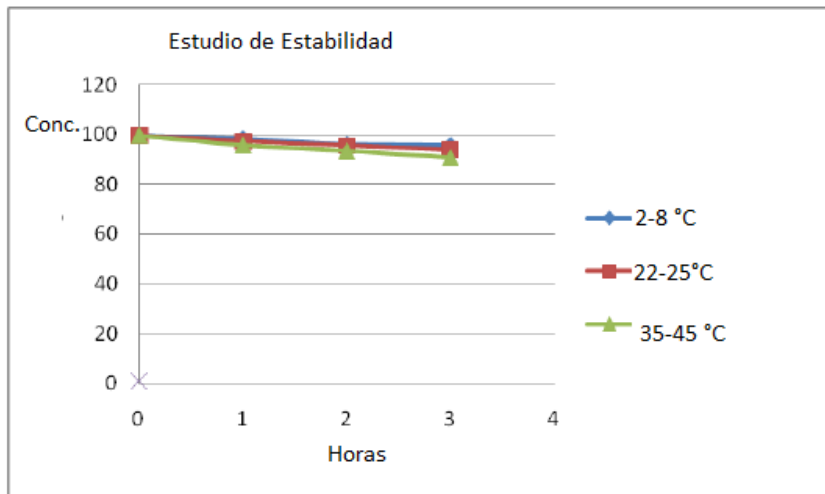


Figura 9. Estabilidad

## 11.7. Efecto de la matriz.

La alteración de la respuesta del analito debido a la presencia de otros componentes de la matriz. (Ver figura 10)

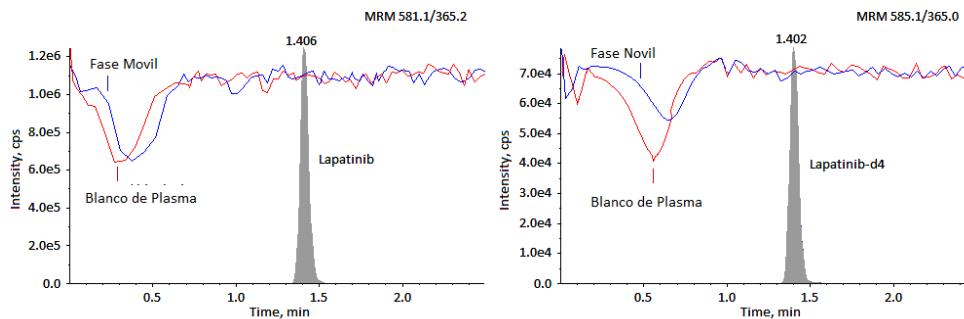


Figura 10. Efecto de la Matriz

### 11.8. Recobro

Eficiencia de la extracción de un método analítico, expresado como porcentaje de la cantidad conocida de analito, obtenido de la comparación de los resultados analíticos de muestras adicionadas con los estándares y sometidas al proceso de extracción, con los resultados analíticos de las soluciones estándar en solución o extraídas. (Ver figura 11)

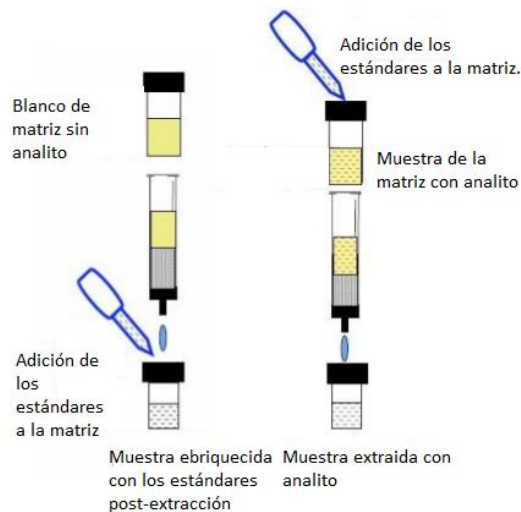


Figura 11. Recobro

### 11.9. Reproducibilidad.

La precisión del método en las mismas condiciones de operación durante un período corto de tiempo (varias ejecuciones o días). Esto se determina típicamente usando muestras control.

### 11.10. Estándares de referencia.

Se deben usar estándares analíticos de identidad y pureza conocidas durante la validación del método y el análisis de muestras. Se debe disponer de un certificado de análisis u otra documentación que respalde la identidad y la pureza de la norma para cada lote utilizado.

12. ANÁLISIS COMPARATIVO ENTRE LAS GUÍAS NACIONALES E INTERNACIONALES DE LOS PARÁMETROS DE VALIDACIÓN: DEFINICIONES, MÉTODOS Y CRITERIOS DE ACEPTACIÓN ([ANVISA 2012](#), [EMA 2012](#), [COFEPRIS 2013](#), [MHLW 2013](#), [FDA 2018](#))

Garantizar la salud y la seguridad del paciente es un objetivo común para la industria farmacéutica, sus socios de investigación por contrato y la mayoría de los que regulan ambos. En los últimos 30 años, los medicamentos se han vuelto cada vez más potentes y solo los avances en la tecnología han permitido la medición de los fármacos y sus metabolitos en las concentraciones circulantes más bajas.

Paralelamente, los usuarios de los datos de concentración de medicamentos, los farmacocinéticos, han solicitado datos con mayor precisión y exactitud para permitir el desarrollo de mejores modelos que puedan respaldar los registros de medicamentos. La respuesta de las autoridades de salud a la mayor importancia de los datos farmacocinéticos dentro de un archivo ha sido aumentar sus niveles de escrutinio e implementar nuevas regulaciones y guías diseñadas para asegurar la ciencia y calidad de datos en validaciones bioanalíticas y el análisis de muestras de estudios clínicos y no clínicos, para fármacos y metabolitos.

Los científicos bioanalíticos operan en este medio de ciencia sólida, calidad de datos, cumplimiento regulatorio y tecnología avanzada. En la última década, se han sentido presiones adicionales ya que la industria farmacéutica enfrenta dificultades para reducir sus costos operativos mientras que al mismo tiempo busca que sus medicamentos se encuentren en todo el mundo. La reducción de costos para el bioanálisis se ha logrado en muchos laboratorios mediante la implementación de tecnología apropiada, pero es la globalización de las filtraciones lo que ha hecho que el bioanalista se mueva hacia adentro en sus operaciones de laboratorio en relación con las regulaciones de su propio país, mirando hacia afuera las regulaciones que gobiernan el bioanálisis desde múltiples países y regiones. Si bien existe un núcleo de similitud entre las reglas y recomendaciones promulgadas por varias autoridades de salud, existen diferencias y, a veces, conflictos. ([Wenkui Li, 2013](#))

La regulación del bioanálisis ha tenido muchas raíces. En esencia, todos están diseñados para mostrar que el método y, por lo tanto, los datos que se generan son sólidos y confiables para su propósito previsto. Existen diferentes caminos para demostrar la validez de los datos y en la actualidad se han encontrado alternativas para responder a los hallazgos encontrados en las auditorias.

Un reto para los científicos bioanalíticos de LC-MS / MS al trabajar a través de las regulaciones de varios países es la comprensión de la terminología. Al igual que cualquier área de nueva ciencia, los científicos que participan en validaciones y bioanálisis regulados comenzaron sin necesidad de cálculos exhaustivos y claros, cada uno con sus propias perspectivas sobre lo que se necesitaba para cumplir datos científicamente sólidos y de calidad. Pero a medida que la comunidad científica publicó la metodología, se reunió en conferencias, creó documentos oficiales y más tarde interactuó con la comunidad reguladora, ellos aceptaron y utilizaron definiciones únicas para permitir comunicaciones claras y efectivas. Se puede ver un ejemplo de dicha evolución en las definiciones de validación, validación parcial y validación cruzada que se obtuvieron en 16 años a partir de la primera tercera conferencia APAP / FDA CrystalCity en validación bioanalítica. ([Wenkui Li, 2013](#))

Se ha mencionado ya la historia y las bases de la validación de métodos bioanalíticos y las perspectivas de las guías más representativas a continuación se desarrollará cada punto de los parámetros de validación estableciendo un criterio universal.

## 12.1. Selectividad y Especificidad

### 12.1.1. Definición

La Norma Mexicana 177 SSA1 2013 define a la selectividad como a la capacidad de un método analítico para diferenciar y cuantificar el compuesto a analizar, en presencia de otros compuestos en la muestra, la, la guía de ANVISA 2012 y MHLW 2013 comparten similitudes con ésta definición solo que las dos guías mencionadas incluyen la selectividad tanto para el analito y el estándar interno, EMA 2012 incluye en la

definición a la selectividad del estándar interno y de los analitos de interés, sin embargo en las tres guías no se considera la diferencia entre selectividad y especificidad, de acuerdo con Hassan 2000, selectividad y especificidad son dos conceptos diferentes y no son equivalentes entre ellos, definiendo a la selectividad de un ensayo es una medida de la medida en que el método puede determinar un particular compuesto en las matrices analizadas sin interferencia de los componentes de la matriz.

Un método que es perfectamente selectivo para un analito o grupo de analitos entonces se vuelve específico. ([Aboul-Enein, 2000](#)) El procedimiento de validación debe confirmar la capacidad del método para evaluar inequívocamente el analito en presencia de otros componentes que pueden ser presente (por ejemplo, impurezas, productos de degradación y componentes de la matriz).

Por lo tanto la especificidad solo es cuando determina el analito sin ninguna interferencia. ([Aboul-Enein, 2000](#)) El término especificidad describe la capacidad del método bioanalítico para producir señal solo para el analito de interés y no para otros componentes interferentes tales como impurezas endógenas, componentes de la matriz, metabolitos, degradantes, etc.

Considerando que la selectividad describe la capacidad de un método para diferenciar el analito de interés de otros analitos o impurezas endógenas presentes en la muestra. ([Kollipara, Bende et al. 2011](#)) La clave está en que la especificidad existe ausencia total de interferencias para el analito mientras que en la selectividad no hay ausencia total de interferencias pero las interferencias se pueden diferenciar la molécula de interés con un grado de precisión y exactitud.

La Guía EMA 2012 y USFDA 2018 son las directrices que distinguen y diferencian ambos conceptos de manera puntual, la EMA 2012 define la selectividad es la capacidad del método bioanalítico para medir y diferenciar el (los) analito (s) de interés y el estándar interno en presencia de componentes que se puede esperar que estén presentes en la muestra. Especificidad es la capacidad de medir el analito inequívocamente en presencia de otros compuestos, ya sean exógenos o endógenos, en la matriz mientras que la FDA 2018 define Selectividad a la medida en que el método puede determinar un compuesto particular en las matrices analizadas sin

interferencia de los componentes de la matriz. Especificidad la capacidad del método para evaluar, inequívocamente, el analito en presencia de otros componentes que se espera que estén presentes (por ejemplo, impurezas, productos de degradación, componentes de la matriz, etc.).

Tomado las principales ideas de cada definición y con base en los conceptos de los expertos en Bioanálisis, la Selectividad se puede definir como, la Capacidad y medida de un método bioanalítico para diferenciar, medir y cuantificar a los analito (s) y el estándar (es) interno (s) en presencia de otros componentes que se pueden esperar en la muestra. La especificidad se puede definir como la capacidad del método para evaluar y medir inequívocamente al analito (s) y estándar (es) interno (s) en presencia de otros compuestos ya se endógenos o exógenos que se espera que estén presentes en la muestra (por ejemplo, impurezas, productos de degradación, componentes de la matriz).

#### 12.1.2. Método

La Norma Mexicana 177 SSA1 2013 establece que se deben analizar 6 unidades de matriz biológica, analizar la matriz biológica normal, lipémica y hemolizada (por lo tanto se entiende a cualquier tipo de matriz Plasma, Suero, Sangre y Orina), sin embargo para sangre no existe la cualidad de sangre hemolizada y para el caso de la orina no se presenta la cualidad orina con lipemia o hemolisis, considerar posibles interferencias de fármacos de uso común, metabolitos, anticoagulantes u otras sustancias que puedan estar presentes en la matriz biológica.

En el caso de métodos donde el fármaco de interés sea una entidad endógena, la evaluación de la selectividad se centra en que el método sea capaz de diferenciar la cuantificación del fármaco de interés adicionado intencionalmente del endógeno, presente en la matriz biológica que pueda interferir en la cuantificación.

ANVISA 2012 establece que se debe analizar un mínimo de 6 unidades de matriz de fuentes distintas: cuando la matriz biológica es plasma deben ser 4 unidades normales,



1 lipémica y 1 hemolizada, cuando la matriz es sangre se deben analizar 5 unidades normales y una lipémica. Cuando se evalúan otras matrices biológicas sus características deben ser validadas y aprobadas. Si una o más muestras analizadas presentan interferencia por encima de los límites establecidos, se deben probar al menos otras seis unidades provenientes de diferentes fuentes. Si una o más muestras del segundo grupo presentan interferencias por encima de los límites establecidos, el método debe modificarse para eliminar la interferencia.

La FDA 2018 establece que, durante el desarrollo del método, el patrocinador debe verificar que la sustancia que se está midiendo es el analito deseado para minimizar o evitar la interferencia. La selectividad del método se demuestra rutinariamente analizando muestras en blanco de la matriz biológica apropiada (por ejemplo, plasma) de múltiples fuentes. Dependiendo del uso previsto del ensayo, el impacto de muestras hemolizadas, muestras lipémicas o muestras de poblaciones especiales puede incluirse en la evaluación de selectividad.

Cuando se utilizan métodos de cromatografía líquida / espectrometría de masas (LC / MS), el patrocinador o el solicitante debe determinar los efectos de la matriz sobre la supresión iónica, la mejora de iones o la eficacia de la extracción. Deben evaluarse los estándares internos para evitar la interferencia con el analito. Las posibles sustancias interferentes en una matriz biológica incluyen componentes de la matriz endógena, como metabolitos, productos de descomposición, y del estudio real, medicamentos concomitantes y otros xenobióticos. Si se usa un estabilizador o un inhibidor de la enzima durante la recolección de la muestra, el patrocinador debería evaluar el potencial de interferencia en la cuantificación del analito. Los patrocinadores deben hacer un juicio científico sobre la necesidad de evaluar estas (y otras) posibles interferencias durante el desarrollo del método.

Durante la validación, el patrocinador debe confirmar que el ensayo está libre de posibles sustancias interferentes, incluidos componentes de la matriz endógena, metabolitos, medicamentos concomitantes anticipados, etc. Si la muestra del estudio contiene más de un analito y los analitos están destinados a ser cuantificados por

diferentes métodos, el patrocinador debe probar cada método para la interferencia del otro analito.

El patrocinador debería analizar muestras en blanco de la matriz biológica apropiada (por ejemplo, plasma) de al menos seis (para métodos cromatográficos). Analice muestras en blanco de la matriz biológica apropiada de al menos seis fuentes individuales.

La especificidad del método debe evaluarse para determinar la interferencia de moléculas que reaccionan de forma cruzada, medicamentos concomitantes, especies biotransformadas, etc.

EMA 2012 indica que el método analítico debe ser capaz de diferenciar el análisis de interés y de los componentes integrados en la matriz u otros componentes del ejemplo. La selectividad debería ser proporcionada utilizando al menos 6 fuentes individuales de la matriz en blanco, que se analicen individualmente y se han evaluado para la interferencia. El uso de menos fuentes de lotes es aceptado en caso de escasez de matrices. También puede ser necesario investigar el rango de cualquier interferencia causada por los metabolitos del fármaco (s), la interferencia de los productos de degradación producidos durante la preparación de la muestra, y la interferencia de las posibles combinaciones de medicamentos.

Las co-medicaciones que se utilizan habitualmente en el área de estudio de la población que puede causar interferencia se debe escribir en cuenta en la fase de validación de métodos, o en un estudio específico y compuesto específico.

Se debe evaluar la posibilidad de una conversión posterior de un metabolito en un proceso de análisis durante los sucesivos sucesos del análisis (incluyendo procedimientos de procesamiento y análisis en el espectrómetro de masas, metabolitos de oxidación y glucoronidación, estructuras con anillos de lactona). Si esto sucede en el análisis de las muestras de un estudio se debe establecer la escala de la conversión de nuevo y el impacto en los resultados de estudio realizados. Se considera que esta evaluación no se puede predecir durante el desarrollo de un nuevo método cuando el metabolismo no se haya evaluado. Sin embargo, se espera que este problema se resuelva y se realiza una validación parcial si se considera que el interés

por el metabolismo de las reacciones activas se produce durante el desarrollo del fármaco.

Se reconoce que en algunos casos es muy difícil para obtener los metabolitos de interés. Alternativamente la inter-conversión del metabolito se puede comprobar mediante el análisis de la muestra de reanálisis. Sin embargo, en este caso, la posibilidad de realizar cambios durante el procesamiento de muestras no se puede deshacer.

La guía MHLW 2013 indica que se evalúan las muestras en blanco, con un mínimo de 6 fuentes individuales. Se debe confirmar la ausencia de interferencia con cada análisis del analito y estándar interno. En el caso de que la matriz es de limitada disponibilidad, puede ser aceptable para utilizar matrices de muestras obtenidas de menos de 6 fuentes.

De manera integral todas las guías coinciden en que la selectividad se debe realizar de al menos seis fuentes distintas de matriz biológica, en éste sentido tanto la guía mexicana como la brasileña son puntuales en que además de analizar muestras normales se deben considerar el análisis de matriz biológica lipémica y hemolizada, solo la guía de Brasil es específica en las cantidades y cualidades del tipo de matriz biológica que se deben analizar, EMA 2012 y MHLW 2013 consideran los casos en que la matriz sea escasa y considera la posibilidad de analizar un número menor de fuentes distintas, esto debe ser altamente considerado para matriz bilógicas no comunes o difíciles de obtener. Tanto COFEPRIS 2013, FDA 2018 y EMA 2012, comentan, aunque no de manera puntual el análisis de la selectividad incluyendo, metabolitos, fármacos concomitantes, anticoagulantes especiales, y todo aquello que se considere que puede interferir en la matriz, sin embargo, en ninguna de las guías se establece la metodología para la evaluación de la selectividad de manera cuantitativa.

Por lo tanto, después de haber analizado a cada una de las guías se considera que para plasma: Evaluar 6 unidades de plasma normales de diferentes fuentes, 1 plasma lipémico y 1 plasma hemolizado. Sangre Total: 4 unidades de sangre total de diferentes fuentes y sangre lipémica. Suero: Evaluar 6 lotes de suero normales de fuentes

diferentes, un suero lipémico y 1 suero hemolizado. Orina: Evaluar 6 unidades de orina de diferentes fuentes.

De acuerdo a lo anterior con la matriz biológica que haya resultado ser normal y selectiva se debe demostrar al menos por triplicado la no interferencia, fármacos administrados concomitantemente, los metabolitos siempre y cuando se encuentren disponibles como sustancia de referencia en el mercado. La Inter-conversión de metabolitos, anticoagulantes especiales o cualquier sustancia que pueda ser un interferente potencial.

Se debe demostrar la selectividad de manera cualitativa es decir demostrar la ausencia de señal cerca del tiempo de retención de los analitos y estándares internos; de manera cuantitativa con precisión y exactitud se debe demostrar la selectividad haciendo evaluaciones por triplicado de cada condición de la matriz o de cada variable adicionada a la matriz, por ejemplo en presencia de otros componentes interferentes potenciales o una cualidad específica de la matriz adicionando el analito al nivel de las muestras control bajo y muestra control alto y el estándar interno e interpolando las concentraciones recuperadas en una curva de calibración de referencia.

### 12.1.3. Criterios de Aceptación

Todas las guías mencionadas en este trabajo a excepción de FDA 2018, comparten que el criterio de aceptación es: la respuesta analítica de las interferencias próximas al tiempo de retención debe ser menor al 20 % para el límite inferior de cuantificación del analito y del 5 % para el estándar interno.

Solo FDA 2018 indica Los calibradores en blanco y cero deben estar libres de interferencia en los tiempos de retención del analito (s) y el IS, que el comparador que es el límite inferior de cuantificación debe encontrarse  $\pm 20$  % de la concentración nominal la respuesta de IS en el espacio en blanco no debe exceder el 5 % de las respuestas IS promedio de los calibradores y muestras control., lo que no lleva a pensar que la prueba debe ejecutarse con cada una de las variables de la matriz

interpolando los resultados en una curva de calibración con muestras control de referencia.

Integrando todos los criterios de aceptación se establece que:

Los calibradores en blanco y cero deben estar libres de interferencia en los tiempos de retención del analito (s) y el estándar interno. Si presentan interferencias estas deben ser menor al 20% de la señal del analito.

Las muestras enriquecidas deben ser  $\pm 20\%$  del Límite inferior de Cuantificación.

La respuesta de estándar interno en el espacio en blanco no debe exceder el 5% de las respuestas del estándar interno promedio de los calibradores y muestras control.

La concentración de la recuperación de las muestras control bajo y muestra control alto debe encontrarse  $\pm$  el 15 % de la concentración nominal y con un coeficiente de variación  $\leq$  al 15 %.

En la tabla 3 se encuentra un resumen de las diferencias encontradas para la selectividad en cada una de las guías y como se pueden unificar los conceptos, métodos y criterios de aceptación.

Tabla 3. Selectividad

Rubro/Guía	Norma Mexicana-177-SSA1(COFEPRIS 2013)	Validación de Métodos Bioanalíticos, Guía para la Industria (USFDA 2018)	Guía para la validación de Métodos Bioanalíticos (ANVISA , 2003,2012)	Borrador de guía para la validación de métodos bioanalíticos en el desarrollo Farmacéutico (MHLW 2013)	Guía en validación de Métodos Bioanalíticos (EMA 2012)	Propuesta
Definición	Diferenciar y cuantificar al compuesto en presencia de otros	Selectividad y Especificidad	Diferenciar y Cuantificar al analito y estándar interno	Diferenciar y Cuantificar al analito y estándar interno (de exógenos y endógenos)	Medir y diferenciar analito y estándar interno	Selectividad ,Especificidad, Analito, Estándar Interno, Endógenos y Exógenos
Método	6 unidades de Matriz, Normales, Lipémico y Hemolizado	6 unidades de Matriz	4 Normales Plasma, 1 Lipémico y 1 Hemolizado, 5 normales sangre y 1 Lipémico	6 unidades o menos si es limitada	6 unidades o menos si es limitada	Plasma 6 normales, 1 Lipémico, 1 Hemolizado , Sangre 5 Normales 1 Lipémico, Cualitativo y Cuantitativo
Criterios de Aceptación	≤ 20 % Analito LIC ≤ 5 % E.I LIC	≤ 20 % Analito LIC ≤ 5 % E.I Promedio de CC Y MC, LIC 20 % DEA	≤ 20 % Analito LIC ≤ 5 % E.I LIC	≤ 20 % Analito LIC ≤ 5 % E.I LIC	≤ 20 % Analito LIC ≤ 5 % E.I LIC	≤ 20 % Analito LIC ≤ 5 % E.I Promedio de CC Y MC, LIC 20 % DEA, MC ≤ 15 % C.V. Y DEA

## 12.2. Exactitud

### 12.2.1. Definición

De acuerdo con la Norma Mexicana 177 SSA1 2013 la Exactitud, a la concordancia entre el valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia, todas las guías contempladas en este escrito coinciden en la definición de exactitud, la definición de la FDA 2018 a diferencia de las otras guías nombra a la exactitud también veracidad, EMA 2012 añade a la definición que exactitud se expresa en porcentaje.

La definición de exactitud es en términos generales un concepto universal que no cambia en ninguna parte del mundo por lo que enriquecer la definición no es necesario ya que el término es puntual y al mismo tiempo simple.

Por lo tanto, la definición que refleja la expresión de las guías es: El grado de concordancia entre el valor experimental determinado por el método y el valor real o verdadero bajo condiciones establecidas, expresado en porcentaje, la exactitud también se conoce como veracidad.

### 12.2.2. Método.

La Norma Mexicana 177 SSA1 2013 establece que la exactitud se determina a partir de los datos de repetibilidad y reproducibilidad, para la ejecución de estas pruebas se debe analizar al menos por quintuplicado en 3 corridas analíticas diferentes y en al menos 2 días, las muestras control LIC, MCB (3 veces el límite inferior de cuantificación), MCM (concentración intermedia entre la muestra control baja y la muestra control alta) y MCA (concentración entre el 75-85 % de la concentración del límite superior de cuantificación) y en el caso de la Repetibilidad se analiza en un solo día las muestras LIC, MCB, MCM MCA y MCD (muestra control diluida).

La guía Europea EMA 2012, describe de manera muy puntual la forma de evaluar la exactitud, indica que a las muestras control se les adiciona una cantidad conocida del analito y se interpolan en una curva de calibración, la preparación de la curva de

calibración y las muestras control se realiza a partir de la preparación de dos soluciones stock independientes, la exactitud se mide en con respecto al valor nominal y se reporta en porcentaje, igualmente que la NOM 177 SSA1 la exactitud se evalúa dentro de la Repetibilidad con un mínimo de 5 muestras por nivel, MCB (3 veces el límite inferior de cuantificación), MCM (50 % del rango de la curva de calibración), MCA (al menos el 75% del límite superior de cuantificación) con al menos 4 niveles de concentración y Reproducibilidad se evalúa con el mismo número de muestras con 3 corridas analíticas pero en al menos 2 días diferentes.

ANVISA 2012, igual que la NOM 177 SSA1 la exactitud se evalúa con dentro de la repetibilidad 5 réplicas 5 niveles y reproducibilidad con 3 corridas diferentes en al menos 2 días, FDA 2018 establece la evaluación de la exactitud en 3 corridas independientes con cuatro niveles de concentración (muestras control) y  $\geq 5$  réplicas, a diferencia de las otras guías la FDA contempla la evaluación de más de 5 réplicas de las muestras control, MHLW 2013 contempla el mismo método que la guía de EMA 2012.

En resumen, todas guías comparten que la exactitud se evalúa dentro de las pruebas de repetibilidad y reproducibilidad, para hacer la prueba de exactitud incluyente a todas la guía se debe evaluar la Repetibilidad con un mínimo de 5 muestras por nivel, MCB (3 veces el límite inferior de cuantificación), MCM (50 % del rango de la curva de calibración), MCA (al menos el 75 % del límite superior de cuantificación) y MCD (muestra control diluida) con al menos 6 repeticiones y la Reproducibilidad se evalúa con el mismo número de muestras con 3 corridas analíticas pero en al menos 2 días diferentes.

### 12.2.3. Criterios de aceptación

La concentración media debe estar dentro del 15 %, excepto para el LIC que debe estar dentro del 20% del valor nominal.

Este criterio de aceptación es universal para todas las guías sin embargo no hay un criterio de aceptación para el porcentaje de cumplimiento que deben tener las



muestras control, de manera particular las guías establecen que para la aceptación de un acorrida analítica se deben aceptar el 67 % de los controles, por lo que se puede establecer la evaluación de 6 repeticiones de cada nivel de concentración (muestras control) y el cumplimiento con los criterios mencionado de 4 muestras de cada nivel, es decir 4 de 6 que representa el 67 %.

En la tabla 4 se encuentra un resumen de las diferencias encontradas para la Exactitud en cada una de las guías y como se pueden unificar los conceptos, métodos y criterios de aceptación.

Tabla 4. Exactitud

Rubro/Guía	Norma Mexicana-177-SSA1(COFEPRIS 2013)	Validación de Métodos Bioanalíticos, Guía para la Industria (USFDA 2018)	Guía para la validación de Métodos Bioanalíticos (ANVISA , 2003,2012)	Borrador de guía para la validación de métodos bioanalíticos en el desarrollo Farmacéutico (MHLW 2013)	Guía en validación de Métodos Bioanalíticos (EMA 2012)	Propuesta
Definición	Concordancia , Valor Experimental y Valor Referencia	Proximidad, Valor determinado y Valor Nominal, Veracidad	Concordancia resultado de ensayo y valor de referencia	Proximidad, entre valor determinado por el método y la concentración Nominal y se expresa en %	Grado de cercanía en concentración determinada y teórica	Concordancia entre el valor experimental y el valor real, se expresa en %.
Método	5 réplicas, 4 Concentraciones, 2 Días, 3 corridas	5 réplicas o más, 4 Concentraciones	5 réplicas, 5 Concentraciones, 3 corridas	5 réplicas 3 corridas	5 réplicas, 4 Concentraciones, 2 Días, 3 corridas	5 réplicas,5 Concentraciones, 2 Días, 3 corridas
Criterios de Aceptación	± 15 % Concentración nominal ± 20 % LIC	± 15 % Concentración nominal ± 20 % LIC	± 15 % Concentración nominal ± 20 % LIC	± 15 % Concentración nominal ± 20 % LIC	± 15 % Concentración nominal ± 20 % LIC	± 15 % Concentración nominal ± 20 % LIC

## 12.3. Precisión

### 12.3.1. Definición

La Norma Mexicana 177 SSA1 2013 la precisión es al grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea; se evalúa como repetibilidad y reproducibilidad. La repetibilidad es precisión bajo las mismas condiciones de operación en un intervalo corto de tiempo y la reproducibilidad es a la precisión bajo las variaciones que comúnmente pueden ocurrir dentro del laboratorio: diferentes días, diferentes analistas, diferentes equipos.

Por su parte EMA 2012, define a la precisión de un procedimiento analítico como la cercanía (grado de dispersión) entre una serie de mediciones obtenidas en las condiciones establecidas. La precisión se define como la relación de desviación estándar / media (%).

ANVISA 2012 establece que la precisión es la proximidad de dos resultados obtenidos por repetidas mediciones de múltiples alícuotas de una única fuente de matriz. FDA 2018 indica que la precisión es la cercanía (es decir, el grado de dispersión) entre una serie de mediciones obtenidas a partir de muestras múltiples de la misma muestra homogénea en las condiciones descritas. MHLW 2013, define que precisión es el grado de proximidad entre concentraciones individuales determinado en medidas repetidas. La precisión se expresa como el coeficiente de variación (CV) o la desviación estándar relativa (DER) en porcentaje.  $\text{Precisión (\%)} = (\text{desviación estándar} / \text{media}) \times 100$ .

Con base en el contenido de cada una de las definiciones de las diferentes guías, La NOM 177SSA1 2013 es el documento que define de manera la precisión y las formas que derivan de esta definición que es la repetibilidad y la reproducibilidad, EMA 2012 y FDA 2018 comparten la misma definición a diferencia que EMA 2012 incluye en su definición la expresión matemática de la precisión, por otra parte MHLW, define de manera puntual el termino de precisión sin embargo no incluye que éste parámetro

debe medirse en condiciones establecidas, sin embargo la expresión matemática de precisión se encuentra bien fundamentada.

Por su parte ANVISA 2012, posee un definición simplista y dirigida a la medición de la precisión en una matriz.

Con base en las aportaciones descritas de cada guía podemos establecer una definición que incluya a todas como se define a continuación.

La precisión es al grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea de una misma matriz bajo condiciones establecidas (es decir el grado de dispersión) y se evalúa como repetibilidad y reproducibilidad. La repetibilidad es precisión bajo las mismas condiciones de operación en un intervalo corto de tiempo y la reproducibilidad es a la precisión bajo las variaciones que comúnmente pueden ocurrir dentro del laboratorio: diferentes días, diferentes analistas, diferentes equipos. La precisión se expresa matemáticamente como el coeficiente de variación (CV) o la desviación estándar relativa (DER) en porcentaje.  $\text{Precisión (\%)} = (\text{desviación estándar} / \text{media}) \times 100$ .

### 12.3.2. Método

La NOM 177 SSA 1 2013 indica que en la Repetibilidad se debe analizar en un mismo día al menos por quintuplicado las siguientes muestras control LIC, MCB, MCM, MCA y MCD (muestra control diluida). Calcular la concentración obtenida para cada nivel interpolando su respuesta analítica en la curva de calibración.

La MCD debe ser realizada para cada factor de dilución que será aplicado a las muestras durante el estudio. La dilución debe ser realizada con la matriz biológica exenta del fármaco. La reproducibilidad se evalúa analizando al menos por quintuplicado en 3 corridas analíticas diferentes y en al menos 2 días, las muestras control LIC, MCB, MCM y MCA.

Para cada MC calcular la concentración recuperada interpolando la respuesta analítica en la curva de calibración. La adición de otro analista o el uso de otro equipo debe

cumplir con los criterios de reproducibilidad. EMA 2012 indica que, se debe demostrar la precisión para las muestras de control de calidad LIC, bajo, medio y alto, dentro de una sola ejecución y entre diferentes ejecuciones, es decir, utilizando las mismas ejecuciones y datos que para la demostración de exactitud y se divide en:

Precisión intradía.

Para la validación de la precisión dentro de la ejecución, debe haber un mínimo de cinco muestras por nivel de concentración en LIC, muestras de MC bajo, medio y alto en una sola ejecución.

Precisión Inter día

Para la validación de la precisión entre ejecuciones, se deben evaluar las muestras de control de calidad LIC, bajo, medio y alto de al menos 3 análisis realizados en al menos dos días diferentes.

Integridad de la dilución.

La dilución de las muestras no debe afectar la exactitud y precisión. Si corresponde, se debe demostrar la integridad de la dilución agregando la matriz con una concentración de analito por encima del LSC y diluyendo esta muestra con una matriz en blanco (al menos cinco determinaciones por factor de dilución).

Por otra parte, ANVISA 2012, indica que la precisión debe ser determinada en una misma corrida (precisión intracorrida), y en 3 corridas diferentes (precisión intercorrida), en cada corrida deben analizarse un mínimo de 5 réplicas de al menos cinco concentraciones diferentes, LIC, MCB, MCM, MCA y MCD, la precisión intercorrida debe realizarse en días diferentes. FDA 2018, indica que la precisión debe medirse en un mismo día y entre días, para la evaluación del parámetro se realizan corridas con 4 niveles de concentración, LIC, MCB, MCM y MCA, con 5 o más repeticiones; la integridad de la dilución se mide por separado con cinco repeticiones de muestra control diluida MCD.

MHLW 2013, establece que la precisión debe evaluarse en 4 diferentes concentraciones (LIC, MCB, MCM y MCA), con cinco repeticiones en cada nivel, la precisión debe evaluarse en una corrida analítica, y en 3 corridas analíticas.

En general todas las guías coinciden en el método de análisis variando únicamente en el número de repeticiones o niveles de concentración evaluada FDA 2018 es la única guía que indica de manera clara que se pueden evaluar más de 5 repeticiones de cada nivel de concentración, EMA 2012 dice que solo se evalúan 4 niveles de concentración tratando la integridad de la dilución como un parámetro independiente.

Analizando todos los métodos de evaluación se puede realizar un método general que incluya todos los requerimientos de las diferentes guías, el cual se enuncia a continuación.

Realizar la reproducibilidad Intradía (Repetibilidad) en un día una corrida con 5 niveles de concentración (LIC, MCB, MCM, MCA y MCD) 6 repeticiones, realizar la reproducibilidad interdía con 4 niveles de concentración (LIC, MCB, MCM y MCA) 6 repeticiones en al menos dos días diferentes con 3 corridas.

### 12.3.3. Criterios de aceptación

- Repetibilidad

Nom 177 SSA1 2013, el CV% del valor promedio no debe ser mayor que el 15 %, excepto para el límite inferior de cuantificación, el cual debe ser menor o igual que 20 %.

EMA 2012, El valor de CV dentro de la ejecución no debe exceder el 15 % para las muestras de CC, excepto para el LIC que no debe exceder el 20%.

FDA 2018,  $\pm 15$  % de las concentraciones nominales; excepto  $\pm 20$  % en LIC.

MHLW 2013, La precisión de las concentraciones determinada en cada nivel no debe exceder el 15 %, excepto en el LIC, donde no debe exceder el 20 %.

- Reproducibilidad

Nom 177 SSA1 2013, el CV% del valor promedio no debe ser mayor que el 15 %, excepto para el límite inferior de cuantificación, el cual debe ser menor o igual que 20 %

EMA 2012, el valor de CV entre ejecuciones no debe exceder el 15 % para las muestras de CC, excepto para el LLOQ que no debe exceder el 20 %.

ANVISA 2012, se mide con el CV, y las variaciones no deben ser mayores al 15 % para las muestras control, excepto para el límite inferior de cuantificación para el cual se admiten valores menores o iguales al 20 %. La precisión y exactitud se calcula con base en todos los valores obtenidos, si la prueba no cumple el ensayo debe ser repetido.

FDA 2018,  $\pm 15\%$  CV, excepto  $\pm 20\%$  CV en el LIC

MHLW 2013, La precisión de las concentraciones determinada en cada nivel no debe exceder el 15%, excepto en el LLOQ, donde no debe exceder el 20 %.

Con base en todos los criterios de aceptación de construye un criterio de aceptación que cumple con todas las guías.

Repetibilidad.

El CV% del valor promedio no debe ser mayor que el 15 %, excepto para el límite inferior de cuantificación, el cual debe ser menor o igual que 20 %. 5 de las 6 repeticiones deben cumplir con los criterios de aceptación y en el cálculo se deben incluir todas las mediciones, si la prueba no cumple se debe evaluar nuevamente.

Reproducibilidad.

El CV% del valor promedio no debe ser mayor que el 15 %, excepto para el límite inferior de cuantificación, el cual debe ser menor o igual que 20 %. 5 de las 6 repeticiones deben cumplir con los criterios de aceptación y en el cálculo se deben incluir todas las mediciones de las 3 corridas en los días evaluados, si la prueba no cumple se debe evaluar nuevamente.

En la tabla 5 se encuentra un resumen de las diferencias encontradas para la Precisión en cada una de las guías y como se pueden unificar los conceptos, métodos y criterios de aceptación.

Tabla 5. Precisión

Rubro/Guía	Norma Mexicana-177-SSA1(COFEPRIS 2013)	Validación de Métodos Bioanalíticos, Guía para la Industria (USFDA 2018)	Guía para la validación de Métodos Bioanalíticos (ANVISA , 2003,2012)	Borrador de guía para la validación de métodos bioanalíticos en el desarrollo Farmacéutico (MHLW 2013)	Guía en validación de Métodos Bioanalíticos (EMA 2012)	Propuesta
Definición	Concordancia entre resultados individuales, repeticiones, Repetibilidad y Reproducibilidad	Proximidad de las mediciones de alícuotas repetidas de una muestra homogénea de matriz biológica	Cercanía de los resultados de múltiples mediciones, de una muestra de matriz	Variación entre las concentraciones individuales determinadas en mediciones repetidas	Cercanía de repeticiones individuales de mediciones del analito se expresa en % CV	Proximidad mediciones de repetidas muestras homogéneas matriz, % CV, Repetibilidad y Reproducibilidad
Método	Repetibilidad 5 Conc. (MCD), 5 repeticiones. Reproducibilidad 5 Réplicas, 4 Conc., 2 Días, 3 corridas	5 réplicas o más, 4 Concentraciones (MCD, se evalúa independiente)	5 réplicas, 5 Concentraciones, 3 corridas	5 réplicas 3 corridas 4 Conc.	5 réplicas, 3 Concentraciones 1 día, 3 corridas 3 Concentraciones 2 días.	Repetibilidad 5 Conc. (MCD), 5 repeticiones. Reproducibilidad 5 Réplicas, 4 Conc., 2 Días, 3 corridas
Criterios de Aceptación	± 15 % CV ± 20 % CV LIC	± 15 % CV ± 20 % CV LIC	± 15 % CV ± 20 % CV LIC	± 15 % CV ± 20 % CV LIC	± 15 % CV ± 20 % CV LIC	± 15 % CV ± 20 % CV LIC



## 12.4. Recobro

### 12.4.1. Definición

La Norma Mexicana 177 SSA1 2013 no define ni contempla en ninguno de sus apartados el recobro, EMA 2012 tampoco incluye la definición del recobro. FDA 2018 define al recobro como la recuperación, la eficiencia de extracción de un proceso analítico, reportado como un porcentaje de la cantidad conocida de un analito realizado a través de las etapas de extracción y procesamiento de la muestra. ANVISA 2012, define al recobro como la eficiencia de la extracción de un método analítico, expresado como porcentaje de la cantidad conocida de analito, obtenido de la comparación de los resultados analíticos de muestras adicionadas con los estándares y sometidas al proceso de extracción, con los resultados analíticos de las soluciones estándar en solución o extraídas. MHLW 2013 define al recobro como la medida de la eficiencia en la cual un método analítico recupera al analito a través del proceso de extracción y el recobro es determinado por la comparación de la respuesta del analito en la matriz biológica, dicha muestra ha sido adicionada con analito y procesada. El recobro es evaluado con al menos 3 réplicas en 3 niveles de concentración (nivel bajo, nivel medio y nivel alto) es importante demostrar la reproducibilidad en cada nivel más que demostrar altos porcentajes de recobro.

Es importante dar una posible explicación de porque EMA 2012 y la NOM 177 SSA1 2013 no consideran el recobro ya que un método analítico que reproducible preciso, exacto lineal y sin efecto de la matriz se entiende que será consistente en el método de extracción en todos los niveles del rango dinámico, por otra parte y está ligado con la idiosincrasia de cada región la suposición de ésta situación no es suficiente, es por ello que FDA, ANVISA y MHLW si consideran el recobro como un parámetro para demostrar la contundencia en la eficiencia del método al ser aplicado.

Por lo anterior si es necesario establecer una definición incluyente a todas las guías. Recobro es la eficiencia del método en los 3 niveles de extracción (nivel bajo, nivel medio y nivel alto) que demuestra en términos de porcentaje la recuperación de una

cantidad conocida (representada con la señal del equipo instrumental) del analito y del estándar interno adicionada a la matriz y que pasa por el proceso de extracción, y es comparada con la concentración (señal del equipo instrumental) del analito y estándar interno de las muestras en solución que no pasaron por el método de extracción, cuando las muestras en solución se preparan con blancos extraídos se trata de un recobro absoluto, cuando las muestras en solución se preparan con blancos de plasma extraídos y enriquecidos con el analito y estándar interno después del proceso de extracción se trata de un recobro relativo. El recobro no necesariamente debe ser del 100 % pero si debe ser reproducible en los 3 niveles con un límite de variación.

#### 12.4.2. Método

FDA 2018 indica que el recobro debe ser evaluado comparando los resultados analíticos de las muestras extraídas (en los niveles bajo, medio y alto) con los correspondientes extractos de blancos adicionados con el analito post-extracción (que representa el 100 % del recobro). ANVISA 2012 indica que el recobro debe realizarse comparando los resultados analíticos de las muestras en 3 concentraciones (bajo, medio y alto, contemplando el rango de linealidad del método con los resultados obtenidos con soluciones estándar no extraídas (que representan el 100 % del recobro). El cálculo del recobro se realiza con la relación de áreas de las muestras extraídas y las no extraídas, ambos para el analito y el estándar interno ambos por separado. MHLW 2013, el recobro es determinado por la comparación de la respuesta del analito en la matriz biológica que es adicionada y procesada, con la respuesta en la muestra blanco de matriz biológica que es procesada y después adicionada con el analito el análisis es aplicado con al menos 3 repeticiones a 3 niveles de concentración (bajo, medio y alto), el recobro % = (respuesta en una muestra de matriz biológica la cual es adicionada con el analito y procesada/ Respuesta de un blanco de matriz biológica que es procesada y después adicionada con el analito) \* 100.

De manera general FDA 2018, ANVISA 2012 y MHLW 2013, indican que la evaluación del recobro se debe hacer en 3 niveles de concentración (bajo, medio y alto), FDA

2018 y MHLW 2013 indican que el recobro debe realizarse con la comparación de muestras enriquecidas con el analito y extraídas de la matriz biológica contra muestras blanco procesadas y después adicionadas con el analito (se trata de un recobro relativo), ANVISA 2012 indica que la comparación debe hacerse con las muestras enriquecidas con el analito y extraídas de la matriz biológica contra muestras en solución del analito que no pasaron por el método de extracción (recobro absoluto). Por otra parte MHLW 2013 y FDA 2018 coinciden en la comparación de la señal de las muestras procesadas y en solución del analito y del estándar interno por separado, mientras que ANVISA 2012 indica que la comparación debe realizarse que con la relación de áreas del analito y del estándar interno por separado. Es hecho suele confundir a menudo como debe realizarse el recobro y como se debe calcular.

Cabe señalar que cuando se realiza el recobro relativo se elimina cualquier efecto de la matriz que pudiera sesgar el verdadero valor del recobro y para calcular el recobro absoluto se debe asegurar que efectivamente no hay efecto de la matriz para obtener un resultado contundente. Por otra parte, el recobro debe ser calculado con la relación de áreas ya que es la unidad de medida utilizada para todos los parámetros de validación ya que ejerce toda compensación de las variaciones del método y el instrumento y los resultados son contundentes.

Por lo anterior el método para la medición del recobro debe realizarse de la siguiente manera.

En 3 niveles de concentración y por triplicado (Bajo, medio y alto) se deben enriquecer las muestras en matriz con el analito y el estándar interno y aplicar el método de extracción, y comparar con las muestras correspondientes de muestras de matriz blanco procesadas y adicionadas con el analito y estándar interno (recobro relativo), adicionalmente comparar con las muestras correspondientes en solución (con analito y estándar interno) no procesadas (recobro absoluto). Comparar las relaciones de área del analito y estándar interno por separado como se describe a continuación:

el recobro relativo % = (relación de áreas en una muestra de matriz biológica la cual es adicionada con el analito y procesada/ relación de áreas de un blanco de matriz biológica que es procesada y después adicionada con el analito) \* 100. el recobro

absoluto % = (relación de áreas en una muestra de matriz biológica la cual es adicionada con el analito y procesada/ relación de áreas en solución) \* 100.

#### 12.4.3. Criterio de Aceptación

FDA 2018 establece que el recobro del analito no necesariamente debe ser del 100 % pero la recuperación del analito y estándar interno debe ser consistente, precisa y reproducible. ANVISA 2012 indica que el recobro en porcentaje debe ser cercano al 100 %, sin embargo, valores bajos son aceptados si el recobro demuestra ser preciso y exacto. MHLW 2013, dice que el recobro debe ser reproducible en cada nivel y esto se prefiere más que mostrar niveles altos de recobro.

Como se puede apreciar el criterio de aceptación para el recobro no es claro, es decir no está definido por un valor numérico, solo se refiere en los tres casos que no necesariamente debe ser el 100 % de recobro pero si debe ser consistente reproducible y exacto, pero éstos 3 atributos ¿cómo se demuestran?, ninguna guía lo menciona sin embargo si nos referimos a la precisión y exactitud en los controles de calidad éstos parámetros deben tener valores menores o iguales a 15 %, por lo tanto si el coeficiente de variación del recobro en los 3 niveles de concentración menor o igual a éste valor se considera que el recobro es consistente, reproducible y exacto.

Por lo anterior el criterio de aceptación general a todas las guías es:

El recobro del analito y el estándar interno expresado en porcentaje no necesariamente debe ser del 100 % pero el coeficiente de variación de en los 3 niveles (bajo, medio y alto) deber ser menor o igual al 15 %, con lo que se demuestra consistencia, reproducibilidad y exactitud en el recobro tanto absoluto como relativo.

En la tabla 6 se encuentra un resumen de las diferencias encontradas para el Recobro en cada una de las guías y como se pueden unificar los conceptos, métodos y criterios de aceptación.

Tabla 6. Recobro

Rubro/Guía	Norma Mexicana-177-SSA1(COFEPRIS 2013)	Validación de Métodos Bioanalíticos, Guía para la Industria (USFDA 2018)	Guía para la validación de Métodos Bioanalíticos (ANVISA , 2003,2012)	Borrador de guía para la validación de métodos bioanalíticos en el desarrollo Farmacéutico (MHLW 2013)	Guía en validación de Métodos Bioanalíticos (EMA 2012)	Propuesta
Definición	No Definido	Eficiencia de la extracción % de la cantidad de analito recuperado.	Eficiencia de la extracción con un límite de variación	Eficiencia del método para recobrar al analito en el procesamiento	No definido	Eficiencia extracción % cantidad analito y E.I. recuperado con límite de variación.
Método	No definido	Extraer muestras MCB, MCM y MCA, Comparar contra blancos extraídos cargados con Analito	Extraer muestras MCB, MCM y MCA, Comparar contra muestras en solución	Extraer muestras MCB, MCM y MCA, Comparar contra blancos extraídos cargados con Analito	No definido	Extraer muestras 5 MCB, 5 MCM y 5 MCA, Comparar contra blancos extraídos cargados con Analito y E.I.
Criterios de Aceptación	No definido	El recobro no debe ser necesariamente del 100 % pero debe ser consistente, preciso y reproducible en el Analito y E.I.	Los recobros al 100 % son deseables, pero se aceptan valores bajos si se demuestra precisión y exactitud.	Demostrar reproducibilidad en los niveles bajos y altos.	No definido	Recobro del analito y E.I. reproducible en los 3 niveles de concentración C.V. % $\leq 15$

## 12.5. Límite de cuantificación.

### 12.5.1. Definición

El límite inferior de cuantificación de acuerdo a la NOM 177 SSA1 2013 es la concentración más baja del analito que puede medirse cumpliendo con la precisión y exactitud, determinada en función de las necesidades de cuantificación del estudio. FDA 2018 indica que el límite inferior de cuantificación es la mínima cantidad de analito que puede ser cuantificada determinada con aceptable precisión y exactitud. ANVISA 2012 define al límite inferior de cuantificación como la cantidad mínima de analito en una muestra que puede ser cuantitativamente determinada con aceptable precisión y exactitud. MHLW 2013 define al límite inferior de cuantificación. La mínima concentración de un analito a la cual dicho analito puede ser cuantificado con precisión y exactitud. EMA 2012 define al límite inferior de cuantificación como la mínima concentración de analito en una muestra la cual puede ser cuantificada con precisión y exactitud.

De forma particular todas las guías coinciden con la definición del límite inferior de cuantificación por lo que el concepto es claro y no presenta variaciones para homologar el concepto por lo que la definición general es:

La concentración mínima de analito presente en una muestra que es cuantificada con precisión y exactitud.

### 12.5.2. Método

La NOM 177 SSA1 2013 indica que el límite inferior de cuantificación se debe determinar con base en el 5 % del  $C_{\text{máx}}$  reportado para el analito de interés, se analiza por quintuplicado en al menos 3 corridas diferentes en al menos 2 días, FDA 2018 establece al límite inferior de cuantificación con al menos 5 repeticiones independientes y se determina el CV %. ANVISA 2012, se determina con al menos 5 determinaciones y se establece el límite de detección diluyendo la muestra. MHLW 2013 indica que el límite inferior de cuantificación se establece de acuerdo a lo

esperado en el estudio. EMA 2012 indica que se debe establecer de acuerdo las concentraciones esperadas del estudio con al menos 5 determinaciones.

Por lo anterior el método que incluye a todas las guías es:

El límite inferior de cuantificación se debe determinar con base en el 5 % del  $C_{m\acute{a}x}$  reportado para el analito de interés, se analiza por quintuplicado en al menos 3 corridas diferentes en al menos 2 días.

### 12.5.3. Criterios de aceptación

La NOM 177 SSA1 2013, indica que el criterio de aceptación es del 20 % en precisión y exactitud. FDA 2018, establece que la señal debe ser al menos 5 veces comparado con un blanco, la respuesta del límite inferior de cuantificación debe ser identificable, discreta y reproducible, con precisión del 20 % y exactitud de 80 al 120 %. ANVISA 2012, debe tener una señal ruido de 5:1 los picos deben ser identificables con precisión del 20 % y exactitud del 80 al 120 %. MHLW 2013, indica que la respuesta del analito debe ser al menos 5 veces en respuesta con comparación al blanco el promedio de la precisión y exactitud debe ser de  $\pm 20$  %. EMA 2012, la señal del analito debe ser al menos 5 veces la señal con respecto al blanco la precisión y exactitud debe ser de  $\pm 20$  %.

Por lo anterior solo la norma Nacional mexicana no contempla la señal ruido como criterio de aceptación, en cambio el resto de las guías coinciden con el criterio de aceptación por lo que el criterio de aceptación se establece a continuación

Límite inferior de cuantificación debe presentar una señal ruido 5:1 con respecto a la muestra blanco, la precisión debe presentar un coeficiente de variación  $\pm 20$  % la exactitud debe encontrarse entre el 80 y 120 %.

En la tabla 7 se encuentra un resumen de las diferencias encontradas para el Límite Inferior de Cuantificación en cada una de las guías y como se pueden unificar los conceptos, métodos y criterios de aceptación.

Tabla 7. Límite Inferior de Cuantificación

Rubro/Guía	Norma Mexicana-177-SSA1(COFEPRIS 2013)	Validación de Métodos Bioanalíticos, Guía para la Industria (USFDA 2018)	Guía para la validación de Métodos Bioanalíticos (ANVISA , 2003,2012)	Borrador de guía para la validación de métodos bioanalíticos en el desarrollo Farmacéutico (MHLW 2013)	Guía en validación de Métodos Bioanalíticos (EMA 2012)	Propuesta
Definición	concentración más baja del analito que puede medirse cumpliendo con la precisión y exactitud.	Cantidad mínima de analito que puede ser cuantificada con precisión y exactitud.	Menor concentración del analito que se distingue del ruido.	Menor concentración del analito que se cuantifica con precisión y exactitud.	Menor concentración del analito que se cuantifica con precisión y exactitud.	concentración más baja del analito que puede medirse cumpliendo con la precisión y exactitud.
Método	5 % de $C_{máx}$ 5 réplicas en 3 corridas	5 réplicas en 3 corridas	5 determinación del LIC, Establecer el LD diluyendo la muestra.	Se debe definir de acuerdo a lo esperado en el estudio.	Se debe definir de acuerdo a lo esperado en el estudio. 5 réplicas	Se define a lo esperado en el estudio 5 réplicas en 3 corridas
Criterios de Aceptación	$\pm 20\%$ de la concentración nominal.	LIC $\geq 5$ veces señal ruido. $\pm 20\%$ de la concentración nominal $\pm 20\%$ CV	LIC $\geq 5$ veces señal ruido. $\pm 20\%$ de la concentración nominal	LIC $\geq 5$ veces señal ruido. $\pm 20\%$ de la concentración nominal	LIC $\geq 5$ veces señal ruido. $\pm 20\%$ de la concentración nominal $\pm 20\%$ CV	LIC $\geq 5$ veces señal ruido. $\pm 20\%$ de la concentración nominal $\pm 20\%$ CV



## 12.6. Linealidad y Curva de Calibración

### 12.6.1. Definición

La NOM 177 SSA1 2013 define Linealidad como la capacidad de un método analítico, en un intervalo de trabajo, para obtener una respuesta proporcional a la concentración del compuesto en la muestra. FDA 2018 define a este parámetro como curva de calibración también llamada curva estándar es la relación entre la respuesta del instrumento y el estándar de calibración dentro de un rango de cuantificación, ANVISA 2012, define también este parámetro como la relación de la respuesta del instrumento a una concentración del analito conocida. EMA 2012 define a la curva de calibración como, la respuesta del instrumento con respecto a la concentración de analito debe ser conocida y debe evaluarse dentro de un rango de concentración específico. MHLW 2013, la curva de calibración demuestra la relación entre la concentración teórica y la respuesta del analito.

De manera general todas las guías coinciden con el concepto, es de esperarse ya que es un término particularmente delimitado sin tendencias a variaciones en la conceptualización de la idea, la NOM 177 y MHLW 2013 no incluyen en su definición que la respuesta generada por el analito es emitida por un instrumento, por el contrario ANVISA 2012, EMA 2012 y FDA 2018 si, incluyen que el instrumento es quien genera la respuesta proporcional del analito con su concentración, por otra parte solo EMA 2012 y FDA 2018 incluyen en su definición que dicha relación respuesta del instrumento-concentración del analito debe encontrarse en un rango definido, por tanto la definición que incluye a todas las guías es:

La respuesta del instrumento con respecto a la concentración de analito debe ser conocida y debe evaluarse dentro de un rango de concentración específico.

### 12.6.2. Método

La NOM 177 SSA1 2013 indica que se debe establecer el intervalo de la curva de calibración en función a las concentraciones esperadas del (os) analito(s) a cuantificar durante el análisis de las muestras. Caracterizar por lo menos seis concentraciones distintas sin incluir las muestras blanco. Definir un modelo matemático que describa adecuadamente la relación entre la concentración y la respuesta, la cual debe ser continua y reproducible en el intervalo de trabajo de la curva de calibración. Cada curva de calibración debe incluir una muestra de blanco de matriz (muestra procesada sin la adición del analito y del EI) y muestra cero (muestra procesada con la adición del EI). Deben ser evaluadas un mínimo de 3 curvas de calibración e incluir los resultados de la concentración recuperada y el por ciento de desviación. FDA 2018 indica que para la curva de calibración se debe evaluar, un blanco (sin analito, sin estándar interno), un calibrador cero (blanco más IS), y al menos seis niveles de calibrantes distintos de cero que cubren el rango de cuantificación, incluyendo límite inferior de cuantificación en cada ejecución. Todos los blancos y calibradores deben estar en la misma matriz que las muestras del estudio. La relación concentración-respuesta debe ajustarse al modelo de regresión más simple. EMA 2012, los estándares de calibración deben prepararse en la misma matriz que la matriz de las muestras de estudio previstas, añadiendo a la matriz en blanco las concentraciones conocidas del analito. Debe haber una curva de calibración para cada analito estudiado en la validación del método y para cada ejecución analítica. Idealmente, antes de llevar a cabo la validación del método analítico, se debe saber qué rango de concentración se espera. Este rango debe estar cubierto por el rango de la curva de calibración, definido por el LIC, que es el estándar de calibración más bajo y el límite superior de cuantificación (LSC), que es el estándar de calibración más alto. El rango debe establecerse para permitir una descripción adecuada de la farmacocinética del analito de interés. Se debe usar un mínimo de seis niveles de concentración de calibración, además de la muestra en blanco (muestra de matriz procesada sin analito y sin IS) y una muestra de cero (matriz procesada con IS). Cada estándar de calibración puede ser analizado por duplicado. Debe aplicarse una relación que pueda describir de manera simple y adecuada la

respuesta del instrumento con respecto a la concentración de analito. Las muestras en blanco y cero no deben tomarse en consideración para calcular los parámetros de la curva de calibración. Los parámetros de la curva de calibración deben informarse (pendiente e intersección en caso de ajuste lineal). Además, las concentraciones calculadas de nuevo de los estándares de calibración deben presentarse junto con los valores de precisión media calculados. Se deben informar todas las curvas disponibles (o aceptables) obtenidas durante la validación, con un mínimo de 3. ANVISA 2012 deben ser construidas y validadas un mínimo de 3 curvas de calibración que incluye una muestra blanco, una muestra cero y un mínimo de 6 muestras diferentes de concentraciones. Las muestras deben ser adicionadas con el analito y después con el estándar interno, después se someten al mismo proceso de preparación que las muestras el estudio. Las curvas de calibración deben prepararse con la misma matriz utilizada en el estudio. Se debe presentar una justificación científica para el rango de concentración contemplado por la curva de calibración. Se debe presentar la ecuación que representa la relación entre la respuesta del instrumento y las concentraciones conocidas del analito. Las respuestas de las muestras blanco y cero no deben utilizarse en la construcción de la ecuación. Se debe adoptar preferentemente el modelo matemático más simple, generalmente el lineal. Si se propone un modelo no lineal, se debe demostrar matemáticamente que el modelo lineal no es adecuado. Para modelos no lineales se deben incluir como mínimo 8 (ocho) muestras de diferentes concentraciones en la curva de calibración. Si la varianza del error no es constante en toda la gama de cuantificación del método analítico, se debe utilizar la ponderación que presenta el menor valor para la suma de los errores relativos de los valores nominales de los patrones de calibración versus sus valores obtenidos por la ecuación de la curva. La ecuación de la curva no debe incluir patrones de calibración que no cumplen los criterios de aprobación. Cuando no se aprueba un patrón de calibración, la curva de calibración se debe volver a calcular sin este patrón. Cuando un patrón de calibración cumple con los criterios de aprobación, éste no debe excluirse de la ecuación de la curva. MHLW 2013, la curva de calibración debe prepararse para cada análisis. La curva de calibración debe prepararse utilizando la misma matriz como las

muestras de estudio, si es posible, adicionando a los blancos de matriz concentraciones conocidas del análisis. La curva de calibración se debe generar con un blanco de muestra, una muestra cero (blanco con estándar interno), y al menos 6 concentraciones de los estándares de calibración, incluyendo un LIC. En general, para la ecuación de regresión y las condiciones de la curva, se debe utilizar un modelo que describa adecuadamente la relación de respuesta y la concentración. El informe de validación debe incluir la ecuación de regresión, correlación y coeficiente de determinación utilizado.

La NOM 177 SSA1 2013 especifica de manera clara el método para la evaluación de la linealidad o curva de calibración y comparte los mismos elementos que FDA 2018 y MHLW 2013, por su parte EMA 2012 marca la diferencia al proponer que la curva de calibración puede evaluarse cada día por duplicado y que durante la validación las curvas deben promediarse y presentar en el informe, por otro lado ANVISA 2012 establece un método de evaluación más completo que abarca distintos panoramas, con respecto a las otras guías, se debe adoptar preferentemente el modelo matemático más simple, generalmente el lineal. Si se propone un modelo no lineal, se debe demostrar matemáticamente que el modelo lineal no es adecuado. Para modelos no lineales se deben incluir como mínimo 8 (ocho) muestras de diferentes concentraciones en la curva de calibración, además La ecuación de la curva no debe incluir patrones de calibración que no cumplen los criterios de aprobación. Cuando no se aprueba un patrón de calibración, la curva de calibración se debe volver a calcular sin este patrón. Cuando un patrón de calibración cumple con los criterios de aprobación, éste no debe excluirse de la ecuación de la curva. Por lo anterior el método de evaluación de la linealidad es el de ANVISA 2012 y el método propuesto de evaluación para cumplir con todas las guías es el siguiente:

Deben ser construidas y validadas un mínimo de 3 curvas de calibración que incluye una muestra blanco, una muestra cero y un mínimo de 6 muestras diferentes de concentraciones. Las muestras deben ser adicionadas con el analito y después con el estándar interno, después se someten al mismo proceso de preparación que las muestras el estudio. Las curvas de calibración deben prepararse con la misma matriz

utilizada en el estudio. Se debe presentar una justificación científica para el rango de concentración contemplado por la curva de calibración integradas en el rango dentro del LIC y LSC. Se debe presentar la ecuación que representa la relación entre la respuesta del instrumento y las concentraciones conocidas del analito. Las respuestas de las muestras blanco y cero no deben utilizarse en la construcción de la ecuación. Se debe adoptar preferentemente el modelo matemático más simple, generalmente el lineal. Si se propone un modelo no lineal, se debe demostrar matemáticamente que el modelo lineal no es adecuado. Para modelos no lineales se deben incluir como mínimo 8 (ocho) muestras de diferentes concentraciones en la curva de calibración. Si la varianza del error no es constante en toda la gama de cuantificación del método analítico, se debe utilizar la ponderación que presenta el menor valor para la suma de los errores relativos de los valores nominales de los patrones de calibración versus sus valores obtenidos por la ecuación de la curva. La ecuación de la curva no debe incluir patrones de calibración que no cumplen los criterios de aprobación. Cuando no se aprueba un patrón de calibración, la curva de calibración se debe volver a calcular sin este patrón. Cuando un patrón de calibración cumple con los criterios de aprobación, éste no debe excluirse de la ecuación de la curva.

### 12.6.3. Criterios de Aceptación

La NOM 177 SSA1 2013 establece que los datos de concentración recuperada de la curva de calibración deben estar dentro del 15% de la concentración nominal en cada nivel de concentración, excepto para el límite inferior de cuantificación, ya que puede ser menor o igual que el 20%. Al menos el 75% de las concentraciones de la curva de calibración con un mínimo de 6 puntos deben cumplir con este criterio. Cuando un punto de la curva de calibración no cumpla con el criterio de aceptación, debe ser rechazado y la curva de calibración debe ser recalculada sin modificar el modelo matemático. Del total de las curvas evaluadas, al menos el 50% de cada nivel de concentración debe cumplir con el criterio del 15% de la concentración nominal y 20% para el límite inferior de cuantificación. FDA 2018 Los calibrantes a excepción de la muestra cero, deben ser  $\pm 15\%$  de las concentraciones nominales, excepto en LIC

donde el calibrador debe ser  $\pm 20\%$  de las concentraciones nominales en cada validación. El 75% y el mínimo de seis concentraciones sin incluir el cero deben cumplir los criterios anteriores en cada validación. EMA 2012, las estimaciones basadas en la calibración estándar deberían estar dentro del 15% del valor nominal, excepto para el LLOQ para el que debe estar dentro del 20%. Al menos el 75% de los calibrantes, con un mínimo de seis niveles de calibración estándar, debe cumplirse este criterio. En los casos de replicación se utilizan, los criterios (dentro de  $\pm 15\%$  o  $\pm 20\%$  para LIC) también deben cumplirse al menos el 50% de la calibración estándar probada por nivel de concentración. Si la curva de calibración no cumple con estos criterios, se debe rechazar esta calibración estándar de muestra y la calibración de la curva sin esta calibración estándar debería volver a evaluar, incluyendo el análisis de regresión. En el caso de que todas las réplicas del LIC o LSC se rechazan se debe rechazar la validación, se debe revisar el origen de los valores y el método revisado (si es necesario). Si la siguiente validación por lotes también falla, entonces el método debería revisarse antes de reiniciar la validación nuevamente. ANVISA 2012, Los patrones de calibración están aprobados cuando cumplen los siguientes criterios: desviación menor o igual al 20% (veinte por ciento) en relación a la concentración nominal para los estándares del LIC; y desviación menor o igual al 15% (quince por ciento) en relación a la concentración nominal para los otros patrones de calibración. La curva de calibración debe cumplir los siguientes criterios para su aprobación: al menos el 75% (setenta y cinco por ciento) de los patrones de calibración deben ser aprobados de acuerdo con los criterios anteriores; y como mínimo 6 (seis) patrones de calibración de concentraciones diferentes, incluyendo el LIC y el LSC, deben ser aprobados conforme a los criterios anteriores. MHLW 2013, La precisión de las concentraciones calculadas de cada estándar de calibración debe estar dentro del 20% de la concentración de la concentración en el LIC, o el  $\pm 15\%$  en todos los demás niveles. Al menos el 75% de la calibración estándar, con un mínimo de 6 niveles, incluido el LIC y los niveles más altos, debería cumplir los criterios anteriores.

En general todas las guías comparten los mismos criterios de aceptación y solo EMA 2012 menciona criterios para el caso de cuando se evalúan 2 curvas de manera

simultánea y menciona la manera de conducirse cuando la prueba de curva de calibración no cumple, las otras guías no mencionan criterios respecto a este último punto, por lo que los criterio de aceptación que incluyen a todas las guías son los siguientes:

Las estimaciones basadas en la calibración estándar deberían estar dentro del 15% del valor nominal, excepto para el LIC para el que debe estar dentro del 20%. Al menos el 75% de los calibrantes, con un mínimo de seis niveles de calibración estándar, debe cumplirse este criterio. En los casos de replicación se utilizan, los criterios (dentro de  $\pm 15\%$  o  $\pm 20\%$  para LIC) también deben cumplirse al menos el 50% de la calibración estándar probada por nivel de concentración. Si la curva de calibración no cumple con estos criterios, se debe rechazar esta calibración estándar de muestra y la calibración de la curva sin esta calibración estándar debería volver a evaluar, incluyendo el análisis de regresión. En el caso de que todas las réplicas del LIC o LSC se rechazan se debe rechazar la validación, se debe revisar el origen de los valores y el método revisado (si es necesario). Si la siguiente validación por lotes también falla, entonces el método debería revisarse antes de reiniciar la validación nuevamente.

En la tabla 8 se encuentra un resumen de las diferencias encontradas para la Linealidad en cada una de las guías y como se pueden unificar los conceptos, métodos y criterios de aceptación.

Tabla 8. Linealidad/Curva de calibración

Rubro/Guía	Norma Mexicana-177-SSA1(COFEPRIS 2013)	Validación de Métodos Bioanalíticos, Guía para la Industria (USFDA 2018)	Guía para la validación de Métodos Bioanalíticos (ANVISA , 2003,2012)	Borrador de guía para la validación de métodos bioanalíticos en el desarrollo Farmacéutico (MHLW 2013)	Guía en validación de Métodos Bioanalíticos (EMA 2012)	Propuesta
Definición	intervalo de trabajo, para obtener una respuesta proporcional a la concentración	Relación entre la respuesta del instrumento y los estándares de calibración en rango	Relación de la respuesta del instrumento y una concentración conocida	Relación de la concentración teórica y la respuesta del analito	Respuesta del analito en una concentración del instrumento	Relación de áreas Anlito/E.l. proporcional a la concentración de los estándares en un rango
Método	6 Conc. Adicional Blanco y Cero, 3 curvas de calibración.	6 Conc. (LIC) Adicional Blanco y Cero, Misma Matriz, Modelo de regresión simple	6 Conc.(LIC) Adicional Blanco y Cero, deben contener al analito y estándar interno.	6 Conc.(LIC) Adicional Blanco y Cero.	6 Conc.(LIC) Adicional Blanco y Cero	8 Conc. Adicional Blanco y Cero, 3 curvas de calibración. Modelo de regresión simple.
Criterios de Aceptación	± 15 % de la conc. Nominal, LIC ± 20 %, 75 % de los calibrantes deben cumplir. Rechazar Incumplimientos y recalcular, 50 % de cada Nivel cumplir	± 15 % de la conc. Nominal, LIC ± 20 %, 75 % de los calibrantes deben cumplir.	± 15 % de la conc. Nominal, LIC ± 20 %,4 de 6 calibrantes deben cumplir. R2 mayor a 0.98	± 15 % de la conc. Nominal, LIC ± 20 %, 75 % de los calibrantes deben cumplir	15 % de la conc. Nominal, LIC ± 20 %, 75 % de los calibrantes deben cumplir. Rechazar Incumplimientos y recalcular, 50 % de cada Nivel cumplir	15 % de la conc. Nominal, LIC ± 20 %, 75 % de los calibrantes deben cumplir. Rechazar Incumplimientos y recalcular, 50 % de cada Nivel cumplir.



## 12.7. Estabilidad

### 12.7.1. Definición

La NOM 177 SSA1 2013 define a la estabilidad como la capacidad de un fármaco, biofármaco o un medicamento de permanecer dentro de las especificaciones de calidad establecidas, en el envase que lo contiene durante su periodo de vida útil. FDA 2018, la estabilidad es una medida del analito intacto (falta de degradación) en una matriz dada dentro de un almacenamiento específico y se compara condiciones iniciales del material a intervalos de tiempo. EMA 2012, define como la estabilidad química de un analito en una matriz dada bajo condiciones específicas a intervalos de tiempo, ANVISA 2012, parámetro dirigido a determinar si un analito se mantiene químicamente sin cambios en una matriz bajo condiciones específicas a ciertos intervalos de tiempo. MHLW 2013, la estabilidad química o biológica de un analito en un disolvente o matriz bajo condiciones específicas en determinados intervalos de tiempo, la estabilidad del analito asegura que la concentración del analito no afecta las muestras a través del proceso desde su colección hasta su análisis.

La NOM 177 SSA1 2013 parece ser una definición muy general y no habla específicamente de la ausencia del cambio de la molécula o entidad química específica, por el contrario EMA 2012, ANVISAS 2013 y FDA 2018 coinciden en que la estabilidad es una medida en que el analito permanece sin cambios en una matriz bajo condiciones específicas a intervalos de tiempo, por su parte MHLW es más enfática en el término de estabilidad al incluir en su definición a la estabilidad en la matriz o en un disolvente y al incluir que la concentración no afecta las mediciones, sin embargo faltó mencionar la parte en que se puntualiza la no degradación o ausencia de cambio en la química de la molécula. En mi opinión y experiencia la ausencia de cambio en la química de la molécula se mide de manera indirecta a través del hecho de que una molécula posee una concentración inicial y ésta no cambia a través del tiempo y bajo condiciones específicas, y si la concentración cambia la estabilidad es

aceptada bajo criterios de precisión y exactitud establecidos. Es por lo que la definición general es la siguiente:

La estabilidad química o biológica de un analito en un disolvente o matriz se dirige para medir si un analito se mantiene químicamente sin cambios bajo condiciones específicas en determinados intervalos de tiempo, la estabilidad del analito asegura que la concentración del analito no afecta las muestras a través del proceso desde su colección hasta su análisis.

#### 12.7.2. Método

La Nom 177 SSA1 2013, evaluar por triplicado la respuesta del analito a las concentraciones de las MCB y MCA, las cuales son analizadas inmediatamente después de su preparación y después de ser sometidas a las condiciones del ensayo evaluadas; Las muestras control son interpoladas en una curva de calibración recién preparada y las concentraciones obtenidas son comparadas contra la concentración nominal. Estabilidad a corto plazo, evaluar la estabilidad del (os) analito(s) en la matriz biológica a la temperatura y tiempo de procesamiento de la muestra, estabilidad a largo plazo, evaluar la estabilidad del (os) analito(s) en la matriz biológica, bajo las condiciones de almacenamiento en las que se mantendrán las muestras, por un periodo de tiempo por lo menos equivalente al que transcurre desde la obtención de la muestra hasta su análisis, estabilidad de la muestra procesada, evaluar la estabilidad del (os) analito(s) en la muestra procesada a temperatura ambiente o bajo las condiciones de almacenamiento a ser usadas durante el estudio, estabilidad en el automuestreador, evaluar la estabilidad del (os) analito(s) en la muestra procesada a la temperatura del inyector o automuestreador, estabilidad ciclos de congelación-descongelación, evaluar la estabilidad del(os) analito(s) en la matriz biológica, almacenadas a la temperatura de congelación en que estarán las muestras reales por al menos 12 h, descongelarlas completamente a temperatura ambiente y volver a congelar por al menos 12 h bajo las mismas condiciones. El número de ciclos de congelación-descongelación debe ser al menos de 3 ciclos, estabilidad en solución, en

caso de no utilizar una solución de referencia de manera inmediata, demostrar la estabilidad del (os) analito(s) y EI (si aplica), en al menos una muestra inyectada por triplicado de una solución de referencia principal (de mayor concentración) y de una solución de trabajo (de menor concentración) por triplicado por un tiempo igual o mayor al periodo de uso o almacenamiento que será utilizado durante el análisis de las muestras; las estabilidades de la solución de referencia principal y de trabajo deben ser evaluadas con una dilución apropiada, teniendo en consideración la linealidad y detector de medición utilizado, el valor promedio de la respuesta analítica del o las soluciones en estudio deben ser comparadas con respecto al valor promedio obtenido por el análisis por triplicado de una solución recién preparada, en el caso de que sea empleado un isótopo estable como en espectrometría de masas, no es necesario realizar un estudio de estabilidad en solución, siempre y cuando se compruebe la ausencia de reacciones de intercambio de isótopos a las mismas condiciones de estabilidad que fueron demostradas para el analito de interés. FDA 2018, durante el proceso de desarrollo, se debe determinar la estabilidad química del análisis en una matriz dada, incluyendo los efectos de la colección de la muestra, el manejo y el almacenamiento de las muestras. Se debe evaluar la estabilidad en automuestreador, estabilidad a temperatura ambiente de la muestra procesada, ciclos de congelación y descongelación, solución madre y estabilidad a largo plazo. Se debe evaluar la estabilidad en la misma matriz del estudio, sin embargo, cuando la matriz es escasa, se debe explorar el uso de matriz surrogada. En el caso de las formulaciones combinadas, las estabilidades deben evaluarse en presencia de las otras moléculas. La estabilidad también debe demostrarse con fármacos concomitantes. En función del análisis, así como de las pruebas de la muestra y de las condiciones, se debe evaluar la estabilidad en sangre, Por ejemplo, un fármaco que es inestable en sangre entera o se absorbe en los componentes móviles durante la colección de la muestra. Durante la validación, las evaluaciones de estabilidad deberían cubrir las condiciones de éxito esperado antes de la recepción en el sitio web (en el sitio clínico, durante el envío, y en otros sitios secundarios), así como durante el análisis y análisis en el sitio. La validación de la estabilidad del fármaco en un fluido se mide en función de las

condiciones de almacenamiento, las propiedades físicas del fármaco, la matriz y el contenedor. La estabilidad de un análisis en un sistema de matrices y contenedores de sistema se corresponde sólo con la matriz y el contenedor de sistema y no debe extrapolarse a otros matrices y contenedores. Si las condiciones de almacenamiento cambian o el análisis de muestras fuera de la condición de validación de la condición de almacenamiento, la estabilidad se debe volver a definir bajo estas nuevas condiciones. La prueba de estabilidad del análisis en la sangre interna debe ser revalidada si es necesaria (si los análisis son inestables durante la extracción de la sangre): Estabilidad en automuestreador se debe considerar la estabilidad en el automuestreador sólo si las características de almacenamiento de las condiciones de almacenamiento de las muestras procesadas son diferentes o no se cubren con la estabilidad de la muestra procesada. Estabilidad en la mesa de trabajo, se debe determinar la estabilidad de las muestras dentro de las condiciones de laboratorio que se esperan para las muestras de estudio (por ejemplo, la estabilidad de muestras mantenidas en una zona de temperatura o se almacena en un contenedor de hielo). Extracto (o muestra procesada): Se debe demostrar la estabilidad de las muestras, incluyendo la residencia temporal en el automuestreador contra estándares de reciente preparación. Ciclos de congelación y descongelación, se debe demostrar mínimo 3 ciclos de congelación-descongelación. Las muestras control deben seguir los mismos procedimientos que las muestras de estudio. Las muestras control se deben congelar durante al menos 12 horas entre los ciclos. Las muestras deben ser comparadas con curvas y controles frescos. Estabilidad a largo plazo, se debe demostrar la estabilidad a largo plazo un período de tiempo igual o mayor para cubrir el tiempo entre la fecha de la primera muestra y la fecha del último análisis de muestras. El almacenamiento de las condiciones de almacenamiento debería ser el mismo que los utilizados para almacenar muestras de estudio. Las muestras deben ser comparadas con curvas y controles frescos, las muestras se almacenan mínimo a una temperatura de 20°C o a temperaturas más frías. Estabilidad de la solución madre, esta estabilidad no se debe evaluar con soluciones madre a punto de expirar a menos que se restablezca la pureza de la sustancia. Cuando la soluciones madre se comparan en un estado físico de la

materia diferente o una solución amortiguadora diferente que indica en el certificado analítico se debe generar datos de estabilidad para justificar la duración de la solución en la condición de almacenamiento. EMA 2012, la evaluación de la estabilidad debe llevarse a cabo para asegurar que cada paso dado durante la preparación de la muestra y el análisis de la misma, así como las condiciones de almacenamiento utilizadas, no afecten la concentración del analito, la estabilidad debe asegurarse para cada paso en el método analítico, lo que significa que las condiciones aplicadas a las pruebas de estabilidad, como la matriz de la muestra, el anticoagulante, los materiales del recipiente, el almacenamiento y las condiciones analíticas deben ser similares a las utilizadas para las muestras de estudio reales. La referencia a los datos publicados en la literatura no se considera suficiente, la estabilidad del analito en la matriz estudiada se evalúa utilizando muestras control bajo y alto (matriz en blanco enriquecida con analito a una concentración de un máximo de 3 veces el LIC y cerca del LSC) que se analizan inmediatamente después de la preparación y después del almacenamiento aplicado las condiciones a evaluar. Las muestras de control de calidad se analizan en función de una curva de calibración, obtenida a partir de estándares de calibración recientes, y las concentraciones obtenidas se comparan con las concentraciones nominales. La estabilidad del stock y las soluciones de trabajo se deben probar con una dilución adecuada, teniendo en cuenta la linealidad y el rango de medición del detector. Los estudios de estabilidad deben investigar las diferentes condiciones de almacenamiento en períodos de tiempo iguales o superiores a las aplicadas a las muestras de estudio reales. ANVISA 2012, Se debe demostrar la estabilidad del analito en la matriz biológica mediante los siguientes estudios; estabilidad después de ciclos de congelación y descongelación, estabilidad de corta duración, estabilidad de larga duración y estabilidad post-procesamiento. Las condiciones de realización de los estudios de estabilidad deben reproducir las condiciones de almacenamiento, preparación y análisis de las muestras en estudio. Los estudios de estabilidad deben utilizar un conjunto de muestras de matriz biológica añadidas de soluciones del analito, estándar interno y el mismo anticoagulante que se utilizará en las muestras en estudio. Se deben emplear al menos 3 muestras de MCB

y MCA, las cuales deben ser analizadas inmediatamente después de su preparación y después de ser sometidas a las condiciones de ensayo aplicables. Se deben emplear sólo muestras cuyo resultado del análisis inmediatamente después de su preparación esté dentro del  $\pm 15\%$  del valor nominal. La concentración de las muestras debe determinarse mediante una curva de calibración recién preparada. Todas las concentraciones obtenidas deben incluirse en el cálculo de la media. Estabilidad después de ciclos de congelación y descongelación, las muestras deben congelarse a la temperatura indicada para el almacenamiento y mantenerse por lo menos 12 horas, siendo entonces sometidas a la descongelación a temperatura ambiente. Cuando estén completamente descongeladas, las muestras deberán congelarse de nuevo a la temperatura indicada para el almacenamiento por lo menos 12 horas, y así sucesivamente, cuantificando el analito en las muestras después del último ciclo. El número de ciclos de congelación y descongelación debe ser igual o mayor al número de ciclos a los que se someterán las muestras en estudio. Estabilidad de corta duración. Las muestras del estudio de estabilidad de corta duración deben ser procesadas y analizadas después de permanecer a temperatura ambiente, o en la temperatura de procesamiento establecida para el método bioanalítico, con un tiempo superior al que las muestras en estudio se mantendrán en las mismas condiciones durante el estudio. Estabilidad de larga duración. Las muestras deben ser procesadas y analizadas después de ser almacenadas por período que exceda el intervalo de tiempo comprendido entre la recolección de la primera muestra en estudio y el análisis de la última. La temperatura utilizada en el estudio de estabilidad debe reproducir la temperatura a la que se almacenan las muestras en estudio. Estabilidad post-procesamiento. Las muestras deben ser procesadas y mantenidas bajo las mismas condiciones de análisis de las muestras en estudio. El período debe ser superior al intervalo de tiempo comprendido entre el término de preparación de las muestras y el final de la corrida analítica más larga. Si se realiza algún almacenamiento más allá del auto-inyector, debe comprobarse la estabilidad en estas condiciones. Estabilidad del analito y estándar interno en solución se debe demostrar la estabilidad del analito y del estándar interno en al menos 3 muestras de la solución primaria de mayor

concentración y de la solución de trabajo de menor concentración por tiempo superior al período de uso o almacenamiento de las mismas. Las soluciones deben ser analizadas después de ser mantenidas bajo las mismas condiciones a las que se someter las soluciones durante su uso y almacenamiento. La estabilidad de las soluciones primarias y de trabajo debe analizarse mediante una dilución apropiada teniendo en cuenta el rango de medición del detector. La media de las respuestas instrumentales provenientes de las soluciones en estudio debe ser comparada con la media de aquellas obtenidas utilizando soluciones recién preparadas del analito y del estándar interno. Si se emplea un isótopo estable como estándar interno, no es necesaria la realización del estudio de estabilidad en solución del mismo, siempre que se haya comprobado la ausencia de reacciones de intercambio de isótopos en las condiciones del estudio de estabilidad. Las soluciones se considerarán estables cuando no se observe una desviación superior al 10 % de sus respuestas en comparación con las respuestas de las soluciones recién preparadas. Todas las respuestas instrumentales obtenidas deben ser incluidas en el cálculo de la media. MHLW 2013, la estabilidad es evaluada para asegurar que la concentración del analito no se afecta en las muestras en cada paso del proceso desde la colección de la muestra hasta el final del análisis. La estabilidad de la muestra debe ser demostrada bajo condiciones lo más cercanas como sea posible a las muestras que son almacenadas y analizadas, se debe tener cuidadosamente y en consideración el disolvente o el tipo de matriz, los materiales contenedores y las condiciones de almacenamiento en el proceso de determinación de la estabilidad. Los estudios de estabilidad comprenden, ciclos de congelación-descongelación, estabilidad a corto plazo (a temperatura ambiente, en hielo o en refrigeración) y estabilidad a largo plazo, la estabilidad de la muestra procesada también debe ser considerada. Los periodos de estabilidad deben ser más largos que los periodos de almacenamiento de las muestras, la estabilidad del analito, de la solución madre y de trabajo, se deben evaluar a las concentraciones cercanas al nivel más alto y el nivel más bajo. La evaluación se realiza con réplicas del análisis al menos 3 veces a cada nivel. La estabilidad del analito en la matriz estudiada es valuada usando niveles de las muestras control bajo y

muestra control alto. Las muestras control deben prepararse usando la matriz de las muestras del estudio, incluyendo los anticoagulantes y los aditivos. La estabilidad se evalúa con réplicas por triplicado, por concentración a cada nivel antes y después del almacenamiento.

Todas las guías describen de manera clara las evaluaciones que se deben realizar para cada prueba de estabilidad, la NOM 177SSA1 2013 y ANVISA 2012 coinciden exactamente en cómo se debe evaluar la estabilidad en solución y a diferencia de las otras guías establecen como se debe evaluar la estabilidad para isotopos radiomarcados, por otra parte MHLW solo menciona las estabilidades que deben ser evaluadas pero no indica cómo se realizan las pruebas, por lo que una definición que incluye a todas las guías es la siguiente:

Evaluar por triplicado la respuesta del analito a las concentraciones de las MCB y MCA, las cuales son analizadas inmediatamente después de su preparación y después de ser sometidas a las condiciones del ensayo evaluadas; Las muestras control son interpoladas en una curva de calibración recién preparada y las concentraciones obtenidas son comparadas contra la concentración nominal

durante el proceso de desarrollo, se debe determinar la estabilidad química del análisis en una matriz dada, incluyendo los efectos de la colección de la muestra, el manejo y el almacenamiento de las muestras. Se debe evaluar la estabilidad en automuestreador, estabilidad a temperatura ambiente de la muestra procesada, ciclos de congelación y descongelación, solución madre y estabilidad a largo plazo. Se debe evaluar la estabilidad en la misma matriz del estudio, sin embargo, cuando la matriz es escasa, se debe explorar el uso de matriz surrogada. En el caso de las formulaciones combinadas, las estabilidades deben evaluarse en presencia de las otras moléculas. La estabilidad también debe demostrarse con fármacos concomitantes. En función del análisis, así como de las pruebas de la muestra y de las condiciones, se debe evaluar la estabilidad en sangre, Por ejemplo, un fármaco que es inestable en sangre entera o se absorbe en los componentes móviles durante la colección de la muestra. Durante la validación, las evaluaciones de estabilidad deberían cubrir las condiciones de éxito esperado antes de la recepción en el sitio web (en el sitio clínico, durante el envío, y



en otros sitios secundarios), así como durante el análisis y análisis en el sitio. La validación de la estabilidad del fármaco en un fluido se mide en función de las condiciones de almacenamiento, las propiedades físicas del fármaco, la matriz y el contenedor. La estabilidad de un análisis en un sistema de matrices y contenedores de sistema se corresponde sólo con la matriz y el contenedor de sistema y no debe extrapolarse a otros matrices y contenedores. Si las condiciones de almacenamiento cambian o el análisis de muestras fuera de la condición de validación de la condición de almacenamiento, la estabilidad se debe volver a definir bajo estas nuevas condiciones. La prueba de estabilidad del análisis en la sangre interna debe ser revalidada si es necesaria (si los análisis son inestables durante la extracción de la sangre).

Los estudios de estabilidad deben utilizar un conjunto de muestras de matriz biológica añadidas de soluciones del analito, estándar interno y el mismo anticoagulante que se utilizará en las muestras en estudio. Se deben emplear sólo muestras cuyo resultado del análisis inmediatamente después de su preparación esté dentro del  $\pm 15\%$  del valor nominal. Todas las concentraciones obtenidas deben incluirse en el cálculo de la media. Estabilidad después de ciclos de congelación y descongelación, las muestras deben congelarse a la temperatura indicada para el almacenamiento y mantenerse por lo menos 12 horas, siendo entonces sometidas a la descongelación a temperatura ambiente. Cuando estén completamente descongeladas, las muestras deberán congelarse de nuevo a la temperatura indicada para el almacenamiento por lo menos 12 horas, y así sucesivamente, cuantificando el analito en las muestras después del último ciclo. El número de ciclos de congelación y descongelación debe ser igual o mayor al número de ciclos a los que se someterán las muestras en estudio. Estabilidad de corta duración. Las muestras del estudio de estabilidad de corta duración deben ser procesadas y analizadas después de permanecer a temperatura ambiente, o en la temperatura de procesamiento establecida para el método bioanalítico, con un tiempo superior al que las muestras en estudio se mantendrán en las mismas condiciones durante el estudio. Estabilidad de larga duración. Las muestras deben ser procesadas y analizadas después de ser almacenadas por período que exceda el intervalo de

tiempo comprendido entre la recolección de la primera muestra en estudio y el análisis de la última. La temperatura utilizada en el estudio de estabilidad debe reproducir la temperatura a la que se almacenan las muestras en estudio. Estabilidad post-procesamiento. Las muestras deben ser procesadas y mantenidas bajo las mismas condiciones de análisis de las muestras en estudio. El período debe ser superior al intervalo de tiempo comprendido entre el término de preparación de las muestras y el final de la corrida analítica más larga. Si se realiza algún almacenamiento más allá del auto-inyector, debe comprobarse la estabilidad en estas condiciones. Estabilidad del analito y estándar interno en solución se debe demostrar la estabilidad del analito y del estándar interno en al menos 3 muestras de la solución primaria de mayor concentración y de la solución de trabajo de menor concentración por tiempo superior al período de uso o almacenamiento de las mismas. Las soluciones deben ser analizadas después de ser mantenidas bajo las mismas condiciones a las que se someter las soluciones durante su uso y almacenamiento. La estabilidad de las soluciones primarias y de trabajo debe analizarse mediante una dilución apropiada teniendo en cuenta el rango de medición del detector. La media de las respuestas instrumentales provenientes de las soluciones en estudio debe ser comparada con la media de aquellas obtenidas utilizando soluciones recién preparadas del analito y del estándar interno. Si se emplea un isótopo estable como estándar interno, no es necesaria la realización del estudio de estabilidad en solución del mismo, siempre que se haya comprobado la ausencia de reacciones de intercambio de isótopos en las condiciones del estudio de estabilidad. Las soluciones se considerarán estables cuando no se observe una desviación superior al 10 % de sus respuestas en comparación con las respuestas de las soluciones recién preparadas. Todas las respuestas instrumentales obtenidas deben ser incluidas en el cálculo de la media.

### 12.7.3. Criterios de Aceptación

NOM 177SSA1 2013, las muestras control son interpoladas en una curva de calibración recién preparada y las concentraciones obtenidas son comparadas contra la concentración nominal. La concentración promedio de cada nivel debe estar dentro del 15 % de la concentración nominal, para la estabilidad en solución en el caso de que sea empleado un isótopo estable como EI en espectrometría de masas, no es necesario realizar un estudio de estabilidad en solución, siempre y cuando se compruebe la ausencia de reacciones de intercambio de isótopos a las mismas condiciones de estabilidad que fueron demostradas para el analito de interés, las soluciones serán consideradas estables si la desviación de la respuesta analítica promedio con respecto a la obtenida con muestras recién preparadas, no es mayor que 10%. Todas las respuestas analíticas obtenidas deben ser incluidas en el cálculo del valor promedio y sólo se pueden eliminar aquellas que presentaron problemas por alguna causa asignable, exclusivamente al sistema analítico. FDA 2018, la exactitud (porcentaje nominal) en cada nivel debe ser  $\pm 15\%$ . EMA 2012, las muestras control deben ser analizadas con una curva de calibración fresca y las concentraciones obtenidas con comparadas con las concentraciones nominales y el promedio de las concentraciones en cada nivel debe ser  $\pm 15\%$  de la concentración nominal. ANVISA 2012, La concentración de las muestras debe determinarse mediante una curva de calibración recién preparada. La estabilidad se demuestra cuando no se observa desviación superior al 15% de la media de las concentraciones obtenidas con relación al valor nominal. Todas las concentraciones obtenidas deben incluirse en el cálculo de la media. Para la estabilidad en solución, si se emplea un isótopo estable como estándar interno, no es necesaria la realización del estudio de estabilidad en solución del mismo, siempre que se haya comprobado la ausencia de reacciones de intercambio de isótopos en las condiciones del estudio de estabilidad.

Las soluciones se considerarán estables cuando no se observe una desviación superior al 10% de sus respuestas en comparación con las respuestas de las soluciones recién preparadas. Todas las respuestas instrumentales obtenidas deben

incluirse en el cálculo de la media. MHLW 2013, el promedio en la exactitud en las mediciones de cada nivel debe estar dentro del  $\pm 15\%$  de la concentración teórica.

Después de analizar cada una de las propuestas de los criterios de aceptación de cada guía se demuestra que todas las guías coinciden en los criterios de aceptación para las estabilidades en la matriz biológica, y solo la guía NOM 177SSA1 2013 y ANVISA 2012, coinciden en los criterios de aceptación para la estabilidad de las soluciones y de los isótopos radiomarcados. Por lo que los criterios de aceptación que incluyen a todas las guías son:

La concentración de las muestras debe determinarse mediante una curva de calibración recién preparada. La estabilidad se demuestra cuando no se observa desviación superior al 15% de la media de las concentraciones obtenidas con relación al valor nominal. Todas las concentraciones obtenidas deben incluirse en el cálculo de la media. Para la estabilidad en solución, si se emplea un isótopo estable como estándar interno, no es necesaria la realización del estudio de estabilidad en solución del mismo, siempre que se haya comprobado la ausencia de reacciones de intercambio de isótopos en las condiciones del estudio de estabilidad. Las soluciones se considerarán estables cuando no se observe una desviación superior al 10% de sus respuestas en comparación con las respuestas de las soluciones recién preparadas. Todas las respuestas instrumentales obtenidas deben incluirse en el cálculo de la media.

En la tabla 9 se encuentra un resumen de las diferencias encontradas para la Estabilidad en cada una de las guías y como se pueden unificar los conceptos, métodos y criterios de aceptación.

Tabla 9. Estabilidad

Rubro/Guía	Norma Mexicana-177-SSA1(COFEPRIS 2013)	Validación de Métodos Bioanalíticos, Guía para la Industria (USFDA 2018)	Guía para la validación de Métodos Bioanalíticos (ANVISA , 2003,2012)	Borrador de guía para la validación de métodos bioanalíticos en el desarrollo Farmacéutico (MHLW 2013)	Guía en validación de Métodos Bioanalíticos (EMA 2012)	Propuesta
Definición	No Definido para fines de Validación de Métodos Bioanalíticos	medida de la falta de degradación en una matriz dada dentro de un almacenamiento	determinar si un analito permanece químicamente inalterado en una matriz dada en condiciones específicas, en cierto tiempo	La estabilidad química o biológica de un analito en un solvente o matriz dado bajo condiciones específicas en intervalos de tiempo dados	La estabilidad química de un analito en una matriz dada bajo condiciones específicas para intervalos de tiempo dados	La estabilidad química o biológica de un analito en un solvente o matriz dado bajo condiciones específicas en intervalos de tiempo dados
Método	ECD (12 h 3 CICLOS), ETA, ELP, ES, EMP, 3 MCB Y MCA	ECD (3 ciclos), ETA, ELP, ES, EMP, 3 MCB Y MCA	ECD (12 h 3 CICLOS, ETA (4-24 h), ELP, ES (6 h), EMP, 3 MCB Y MCA	ECD (12 h 3 CICLOS, ETA, ELP, ES, EMP, 3 MCB Y MCA	ECD (los necesarios), ETA, ELP, ES, EMP, 3 MCB Y MCA	ECD (12 h 3 CICLOS, ETA (4-24 h), ELP, ES (6 h), EMP, 3 MCB Y MCA
Criterios de Aceptación	± 15 % de la concentración nominal. ± 10 % de la concentración nominal. Solución. Isotopos no Inter conversión	± 15 % de la concentración nominal.	± 15 % de la concentración nominal. ± 10 % de la concentración nominal. Solución. Isotopos no Inter conversión	± 15 % de la concentración nominal. Si otro criterio es más apropiado entonces usarlo.	± 15 % de la concentración nominal.	± 15 % de la concentración nominal. ± 10 % de la concentración nominal. Solución

ECD = Ciclos de Congelación-Descongelación, ETA=Estabilidad a Temperatura Ambiente, ELP= Estabilidad a Largo Plazo, ES=Estabilidad en Sangre, EMP= Estabilidad Muestra Procesada.

## 13. DISCUSIÓN

Después de una exhaustiva revisión de cada una de las guías más importantes del mundo se puede resaltar que, aunque existe una definición, un método y criterios de aceptación para cada una de las guías, en cada uno de éstos rubros existen ligeras variaciones que podrían invalidar ciertas pruebas de la validación dependiendo de la región en donde se apliquen los estudios de validación, por lo tanto me di a la tarea de diseñar cada uno de los rubros para establecer definiciones métodos y criterios de aceptación incluyentes a cada una de las guías como se describe en el punto 12 para poder abordar cada una de éstas diferencias a continuación se desglosará por cada parámetro de la validación.

### 13.1. Discusión de Selectividad/ Especificidad

La selectividad y la especificidad son parámetros que comúnmente se confunden para poder aclarar estos conceptos referimos que en la especificidad existe ausencia total de interferencias para el analito mientras que en la selectividad no hay ausencia total de interferencias pero las interferencias se pueden diferenciar la molécula de interés con un grado de precisión y exactitud. La Guía EMA 2012 y USFDA 2018 son las directrices que distinguen y diferencian ambos conceptos de manera puntual, la EMA 2012 define La selectividad es la capacidad del método bioanalítico para medir y diferenciar el (los) analito (s) de interés y el estándar interno en presencia de componentes que se puede esperar que estén presentes en la muestra. Especificidad es la capacidad de medir el analito inequívocamente en presencia de otros compuestos, ya sean exógenos o endógenos, en la matriz mientras que la FDA 2018 define Selectividad a la medida en que el método puede determinar un compuesto particular en las matrices analizadas sin interferencia de los componentes de la matriz. Especificidad es la capacidad del método para evaluar, inequívocamente, el analito en presencia de otros componentes que se espera que estén presentes (por ejemplo, impurezas, productos de degradación, componentes de la matriz, etc.). En cuanto al

método, o de manera integral todas las guías coinciden en que la selectividad se debe realizar de al menos seis fuentes distintas de matriz biológica, en éste sentido tanto la guía mexicana como la brasileña son puntuales en que además de analizar muestras normales se deben considerar el análisis de matriz biológica lipémica y hemolizada, solo la guía de Brasil es específica en las cantidades y cualidades del tipo de matriz biológica que se deben analizar, EMA 2012 y MHLW 2013 consideran los casos en que la matriz sea escasa y considera la posibilidad de analizar un número menor de fuentes distintas, esto debe ser altamente considerado para matriz biológicas no comunes o difíciles de obtener. Tanto COFEPRIS 2013, FDA 2018 y EMA 2012, comentan, aunque no de manera puntual el análisis de la selectividad incluyendo, metabolitos, fármacos concomitantes, anticoagulantes especiales, y todo aquello que se considere que puede interferir en la matriz, sin embargo, en ninguna de las guías se establece la metodología para la evaluación de la selectividad de manera cuantitativa. Hablando de los criterios de aceptación todas las guías mencionadas en este trabajo a excepción de FDA 2018, comparten que el criterio de aceptación es: la respuesta analítica de las interferencias próximas al tiempo de retención debe ser menor al 20 % para el límite inferior de cuantificación del analito y del 5 % para el estándar interno. Solo FDA 2018 indica los calibradores en blanco y cero deben estar libres de interferencia en los tiempos de retención del analito (s) y el IS, que el comparador que es el límite inferior de cuantificación debe encontrarse  $\pm 20$  % de la concentración nominal la respuesta de IS en el espacio en blanco no debe exceder el 5 % de las respuestas IS promedio de los calibradores y muestras control, lo que nos lleva a pensar que la prueba debe ejecutarse con cada una de las variables de la matriz interpolando los resultados en una curva de calibración con muestras control de referencia. En un artículo para la cuantificación simultánea de Dexmedetomidina, Dezocina y Midazolam en plasma de rata por LC-MSMS para su aplicación en un estudio de farmacocinética de publicado por ([Cui, Liu et al. 2018](#)), describen a la selectividad y especificidad como la ausencia de interferencias al tiempo de retención de los analitos de interés bajo la discusión realizada para la selectividad ésta forma de evaluar la selectividad no sería válida para someter los resultados ante la mayoría de

las regulaciones, ya que carece de resultados que demuestren la selectividad de manera cuantitativa, en presencia de otros fármacos, de anticoagulantes, metabolitos y todos aquellos componentes de la matriz que pudieran afectar a la cuantificación de los analitos de interés.

### 13.2. Discusión de la Exactitud.

La definición de exactitud es en términos generales un concepto universal que no cambia en ninguna parte del mundo por lo que enriquecer la definición no es necesario ya que el término es puntual y al mismo tiempo simple para todas las guías. En cuanto al método todas guías comparten que la exactitud se evalúa dentro de las pruebas de repetibilidad y reproducibilidad, para hacer la prueba de exactitud incluyente a todas la guía se debe evaluar la Repetibilidad con un mínimo de 5 muestras por nivel, MCB (3 veces el límite inferior de cuantificación), MCM (50 % del rango de la curva de calibración), MCA (al menos el 75 % del límite superior de cuantificación) y MCD (muestra control diluida) con al menos 6 repeticiones y la Reproducibilidad se evalúa con el mismo número de muestras con 3 corridas analíticas pero en al menos 2 días diferentes. Refiriendo los criterios de aceptación, La concentración media debe estar dentro del 15 %, excepto para el LLOQ que debe estar dentro del 20% del valor nominal. Este criterio de aceptación es universal para todas las guías sin embargo no hay un criterio de aceptación para el porcentaje de cumplimiento que deben tener las muestras control, de manera particular las guías establecen que para la aceptación de un acorrida analítica se deben aceptar el 67 % de los controles, por lo que se puede establecer la evaluación de 6 repeticiones de cada nivel de concentración (muestras control) y el cumplimiento con los criterios mencionado de 4 muestras de cada nivel, es decir 4 de 6 que representa el 67 %.

En un artículo publicado por ([Popowicz, O'Halloran et al. 2018](#)) para la cuantificación simultanea de piperacilina y tazobactam en fluido pleural por LC-MSMS para su aplicación en un estudio de farmacocinética se evalúa a la exactitud para ambos analitos con 4 muestras control por quintuplicado, adicionalmente el límite inferior de



cuantificación, además de la muestra control diluida Inter-día e intra-día en diferentes corridas cumpliendo con los criterios de aceptación del dentro del 15 % para los controles, excepto para el LIC que debe estar dentro del 20% del valor nominal. Los autores refieren que la validación cumple con los requisitos regulatorios de FDA, y efectivamente al menos para este parámetro si cumple y por lo tanto cumple con las otras diferentes guías mencionadas en este trabajo a excepción del criterio propuesto por mi autoría que son 6 repeticiones en lugar de 5 repeticiones de cada control.

### 13.3. Discusión de la Precisión

Con base en el contenido de cada una de las definiciones de las diferentes guías, La NOM 177SSA1 2013 es el documento que define de manera la precisión y las formas que derivan de esta definición que es la repetibilidad y la reproducibilidad, EMA 2012 y FDA 2018 comparten la misma definición a diferencia que EMA 2012 incluye en su definición la expresión matemática de la precisión, por otra parte MHLW 2013, define de manera puntual el termino de precisión sin embargo no incluye que éste parámetro debe medirse en condiciones establecidas, sin embargo la expresión matemática de precisión se encuentra bien fundamentada. Por su parte ANVISA 2012, posee un definición simplista y dirigida a la medición de la precisión en una matriz. En cuanto al método MHLW 2013, establece que la precisión debe evaluarse en 4 diferentes concentraciones (LIC, MCB, MCM y MCA), con cinco repeticiones en cada nivel, la precisión debe evaluarse en una corrida analítica, y en 3 corridas analíticas. En general todas las guías coinciden en el método de análisis variando únicamente en el número de repeticiones o niveles de concentración evaluada FDA 2018 es la única guía que indica de manera clara que se pueden evaluar más de 5 repeticiones de cada nivel de concentración, EMA 2012 dice que solo se evalúan 4 niveles de concentración tratando la integridad de la dilución como un parámetro independiente. Hablando de los criterios de aceptación Nom 177 SSA1 2013, el CV% del valor promedio no debe ser mayor que el 15 %, excepto para el límite inferior de cuantificación, el cual debe ser menor o igual que 20 %

EMA 2012, el valor de CV entre ejecuciones no debe exceder el 15 % para las muestras de muestras control, excepto para el LIC que no debe exceder el 20 %.

#### 13.4. Discusión del Recobro

Éste es uno de los parámetros de la validación que más llama la atención ya que no es contemplado por todas las guías (EMA 2012 y NOM 177 SSA1 2013). Es importante dar una posible explicación de porque EMA 2012 y la NOM 177 SSA1 2013 no consideran el recobro ya que un método analítico que reproducible preciso, exacto lineal y sin efecto de la matriz se entiende que será consistente en el método de extracción en todos los niveles del rango dinámico, por otra parte y está ligado con la idiosincrasia de cada región la suposición de ésta situación no es suficiente, es por ello que FDA, ANVISA y MHLW si consideran el recobro como un parámetro para demostrar la contundencia en la eficiencia del método al ser aplicado. En cuanto a la metodología De manera general FDA 2018, ANVISA 2012 y MHLW 2013, indican que la evaluación del recobro se debe hacer en 3 niveles de concentración (bajo, medio y alto), FDA 2018 y MHLW 2013 indican que el recobro debe realizarse con la comparación de muestras enriquecidas con el analito y extraídas de la matriz biológica contra muestras blanco procesadas y después adicionadas con el analito (se trata de un recobro relativo), ANVISA 2012 indica que la comparación debe hacerse con las muestras enriquecidas con el analito y extraídas de la matriz biológica contra muestras en solución del analito que no pasaron por el método de extracción (recobro absoluto). Por otra parte MHLW 2013 y FDA 2018 coinciden en la comparación de la señal de las muestras procesadas y en solución del analito y del estándar interno por separado, mientras que ANVISA 2012 indica que la comparación debe realizarse que con la relación de áreas del analito y del estándar interno por separado. Es un hecho que suele confundir a menudo como debe realizarse el recobro y como se debe calcular. Cabe señalar que cuando se realiza el recobro relativo se elimina cualquier efecto de la matriz que pudiera sesgar el verdadero valor del recobro y para calcular el recobro absoluto se debe asegurar que efectivamente no hay efecto de la matriz para obtener

un resultado contundente. Por otra parte, el recobro debe ser calculado con la relación de áreas ya que es la unidad de medida utilizada para todos los parámetros de validación ya que ejerce toda compensación de las variaciones del método y el instrumento y los resultados son contundentes. En cuanto a los criterios de aceptación FDA 2018 establece que el recobro del analito no necesariamente debe ser del 100 % pero la recuperación del analito y estándar interno debe ser consistente, precisa y reproducible. ANVISA 2012 indica que el recobro en porcentaje debe ser cercano al 100 %, sin embargo, valores bajos son aceptados si el recobro demuestra ser preciso y exacto. MHLW 2013, dice que el recobro debe ser reproducible en cada nivel y esto se prefiere más que mostrar niveles altos de recobro.

Como se puede apreciar el criterio de aceptación para el recobro no es claro, es decir no está definido por un valor numérico, solo se refiere en los tres casos que no necesariamente debe ser el 100 % de recobro pero si debe ser consistente reproducible y exacto, pero éstos 3 atributos ¿cómo se demuestran?, ninguna guía lo menciona sin embargo si nos referimos a la precisión y exactitud en los controles de calidad éstos parámetros deben tener valores menores o iguales a 15 %, por lo tanto si el coeficiente de variación del recobro en los 3 niveles de concentración menor o igual a éste valor se considera que el recobro es consistente, reproducible y exacto. En un artículo publicado por ([Prathipati, Mandal \*et al.\* 2018](#)) para el desarrollo y validación de por LC-MSMS para la cuantificación de Bictegravir en plasma humano para su aplicación en un estudio de captación intracelular, evalúan al recobro con 6 réplicas de los controles a los niveles bajo, medio y alto, comparando las áreas de la extracción y post-extracción, obteniendo recobros mayores al 96.01 % con un coeficiente de variación no mayor al 3.67 %, por lo tanto ésta validación cumple con todas las guías de validación referidas en éste trabajo y aunque EMA 2012 y la NOM 177 SSA1 2013 no soliciten ésta información, se incluye y aporta un valor agregado a la investigación.

### 13.5. Discusión del Límite de cuantificación

De forma particular todas las guías coinciden con la definición del límite inferior de cuantificación por lo que el concepto es claro y no presenta variaciones para homologar el concepto. En cuanto a la metodología el límite inferior de cuantificación se debe determinar con base en el 5 % del  $C_{\max}$  reportado para el analito de interés, se analiza por quintuplicado en al menos 3 corridas diferentes en al menos 2 días. En cuanto a los criterios de aceptación solo la norma Nacional mexicana no contempla la señal ruido como criterio de aceptación, en cambio el resto de las guías coinciden con el criterio de aceptación por lo que el criterio de aceptación se establece como límite inferior de cuantificación debe presentar una señal ruido 5:1 con respecto a la muestra blanco, la precisión debe presentar un coeficiente de variación  $\pm 20\%$  la exactitud debe encontrarse entre el 80 y 120 %. Un artículo publicado por ([Alam, Al-Jenoobi et al. 2018](#)) en donde se valida un método por UPLC-MSMS para la cuantificación de Glibenclamida en plasma de rata, se evalúa el límite de cuantificación con 3 réplicas el límite inferior de cuantificación y con señal ruido mayor a 5 obteniendo resultados satisfactorios en la señal ruido y cumpliendo con los criterios de aceptación de precisión y exactitud, pero no así con el método empleado, ya que las guías indican de manera clara que se deben evaluar 5 réplicas, es importante señalar que los autores mencionan que la validación se aplicó siguiendo las recomendaciones de FDA, sin embargo con base al límite de cuantificación esto último no se cumple y por lo tanto no se cumple con los criterios de aceptación de las demás guías.

### 13.6. Discusión de la Linealidad y Curva de Calibración

De manera general todas las guías coinciden con el concepto, es de esperarse ya que es un término particularmente delimitado sin tendencias a variaciones en la conceptualización de la idea, la NOM 177 y MHLW 2013 no incluyen en su definición que la respuesta generada por el analito es emitida por un instrumento, por el contrario ANVISA 2012, EMA 2012 y FDA 2018 si, incluyen que el instrumento es quien genera

la respuesta proporcional del analito con su concentración, por otra parte solo EMA 2012 y FDA 2018 incluyen en su definición que dicha relación respuesta del instrumento-concentración del analito debe encontrarse en un rango definido. Refiriendo a la metodología, La NOM 177 SSA1 2013 especifica de manera clara el método para la evaluación de la linealidad o curva de calibración y comparte los mismos elementos que FDA 2018 y MHLW 2013, por su parte EMA 2012 marca la diferencia al proponer que la curva de calibración puede evaluarse cada día por duplicado y que durante la validación las curvas deben promediarse y presentar en el informe, por otro lado ANVISA 2012 establece un método de evaluación más completo que abarca distintos panoramas, con respecto a las otras guías, se debe adoptar preferentemente el modelo matemático más simple, generalmente el lineal. Si se propone un modelo no lineal, se debe demostrar matemáticamente que el modelo lineal no es adecuado. Para modelos no lineales se deben incluir como mínimo 8 (ocho) muestras de diferentes concentraciones en la curva de calibración, además La ecuación de la curva no debe incluir patrones de calibración que no cumplen los criterios de aprobación. Cuando no se aprueba un patrón de calibración, la curva de calibración se debe volver a calcular sin este patrón. Cuando un patrón de calibración cumple con los criterios de aprobación, éste no debe excluirse de la ecuación de la curva. En cuanto a los criterios de aceptación, en general todas las guías comparten los mismos criterios de aceptación y solo EMA 2012 menciona criterios para el caso de cuando se evalúan 2 curvas de manera simultánea y menciona la manera de conducirse cuando la prueba de curva de calibración no cumple, las otras guías no mencionan criterios respecto a este último punto. En un artículo publicado por ([Abdallah, Abdel-Megied et al. 2018](#)) en donde realizaron el desarrollo y validación para la cuantificación simultanea de Sofosbuvir y Daclastasvir en plasma humano para su aplicación en un estudio de farmacocinética, evaluaron la linealidad para cada analito con 8 puntos de calibración, utilizando una ponderación  $1/x^2$  con coeficientes de correlación mayores a 0.99 para cada analito, cumpliendo con los criterios de aceptación de exactitud para cada curva, y se evaluaron 3 curvas en 3 corridas diferentes, los autores mencionan que la validación cumple con las directrices de FDA,

por lo tanto éste parámetro cumple con todas las guías nacionales e internacionales citadas en el presente trabajo.

### 13.7. Discusión de las estabilidades

La NOM 177 SSA1 2013 parece ser una definición muy general y no habla específicamente de la ausencia del cambio de la molécula o entidad química específica, por el contrario EMA 2012, ANVISA 2013 y FDA 2018 coinciden en que la estabilidad es una medida en que el analito permanece sin cambios en una matriz bajo condiciones específicas a intervalos de tiempo, por su parte MHLW es más enfática en el término de estabilidad al incluir en su definición a la estabilidad en la matriz o en un disolvente y al incluir que la concentración no afecta las mediciones, sin embargo faltó mencionar la parte en que se puntualiza la no degradación o ausencia de cambio en la química de la molécula. En mi opinión y experiencia la ausencia de cambio en la química de la molécula se mide de manera indirecta a través del hecho de que una molécula posee una concentración inicial y ésta no cambia a través del tiempo y bajo condiciones específicas, y si la concentración cambia la estabilidad es aceptada bajo criterios de precisión y exactitud establecidos. En cuanto al método todas las guías describen de manera clara las evaluaciones que se deben realizar para cada prueba de estabilidad, la NOM 177SSA1 2013 y ANVISA 2012 coinciden exactamente en cómo se debe evaluar la estabilidad en solución y a diferencia de las otras guías establecen como se debe evaluar la estabilidad para isotopos radiomarcados, por otra parte MHLW solo menciona las estabilidades que deben ser evaluadas pero no indica cómo se realizan las pruebas. En cuanto los criterios de aceptación, Después de analizar cada una las propuestas de los criterios de aceptación de cada guía se demuestran que todas las guías coinciden en los criterios de aceptación para las estabilidades en la matriz biológica, y solo la guía NOM 177SSA1 2013 y ANVISA 2012, coinciden en los criterios de aceptación para la estabilidad de las soluciones y de los isotopos radiomarcados. En un artículo publicado por ([Cirrincione, Penchala et al. 2018](#)) realizan el desarrollo y validación por LC-MSMS para la cuantificación de

Levonorgestrel a plasma a partir de un implante subdérmico, evalúan las estabilidades en los niveles medio, bajo y alto, por sextuplicado en las condiciones de estabilidad en la mesa de trabajo, estabilidad a largo plazo, ciclos de congelación descongelación, estabilidad de la muestra procesada. Los autores refieren que la validación se realizó con los criterios de FDA, sin embargo, al no evaluar la estabilidad de la molécula en sangre no se cumple con los criterios de EMA 2012 y ANVISA 2012, por lo tanto, ésta prueba no cumple con las directrices de todas las guías referidas en este trabajo.

#### 14. CONCLUSIONES

Se realizó una comparativa entre las guías de validación de métodos bioanalíticos cromatográficos para moléculas pequeñas de las entidades regulatorias Internacionales más importantes del mundo (FDA, EMA, ANVISA, MHLW) y la guía de la autoridad nacional mexicana (COFEPRIS). Se encontraron diferencias entre las diferentes guías de las regulaciones Nacionales e Internacionales y entre ellas si se pueden complementar por lo que se estableció una propuesta que incluya a todas las regulaciones citadas, con la finalidad de que los científicos bioanalíticos de laboratorios (Terceros Autorizados y Centros de Investigación Clínica) puedan proponer soluciones inmediatas a los requerimientos de los Patrocinadores con base en el tipo de estudio y a la región o regiones en donde se aplicará el mismo, de tal manera la validación y ejecución de un estudio bioanalítico puede ser sometido a cada región o país específico sin la necesidad de hacer cambios en las metodologías lo que implica reducción de tiempos y evita la repetición de experimentos. Como resultado final la Población de una región o país específico, podrá tener acceso a los medicamentos evaluados con los requisitos apropiados de cada país o región de manera expedita y con los estándares de calidad exigidos.

## 15. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdallah, O. M., A. M. Abdel-Megied and A. S. Gouda (2018). "Development and validation of LC-MS/MS method for simultaneous determination of sofosbuvir and daclatasvir in human Plasma: Application to pharmacokinetic study." Biomed Chromatogr **32**(6): e4186.

Aboul-Enein, H. Y. (2000). "Selectivity versus specificity in chromatographic analytical methods." Accreditation and Quality Assurance **5**(5): 180-181.

Alam, M. A., F. I. Al-Jenoobi and A. M. Al-Mohizea (2018). "Rapid, Validated UPLC-MS/MS Method for Determination of Glibenclamide in Rat Plasma." Int J Anal Chem **2018**: 2569027.

ANVISA (2012). GUIDE FOR VALIDATION OF ANALYTICAL AND BIOANALYTICAL METHODS

RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA – RDC Nº 27, DE 17 DE MAIO DE 2012.

M. d. S. A. N. d. V. Sanitária. Brasil.

Booth, B., M. E. Arnold, B. DeSilva, L. Amaravadi, S. Dudal, E. Fluhler, B. Gorovits, S. H. Haidar, J. Kadavil, S. Lowes, R. Nicholson, M. Rock, M. Skelly, L. Stevenson, S. Subramaniam, R. Weiner and E. Woolf (2015). "Workshop report: Crystal City V--quantitative bioanalytical method validation and implementation: the 2013 revised FDA guidance." AAPS J **17**(2): 277-288.

Chang, M. S., Q. Ji, J. Zhang and T. A. El-Shourbagy (2007). "Historical review of sample preparation for chromatographic bioanalysis: pros and cons." Drug Development Research **68**(3): 107-133.



Cirrinzione, L. R., S. D. Penchala, K. K. Scarsi, A. T. Podany, L. C. Winchester, D. J. Back, S. H. Khoo, C. V. Fletcher, M. Siccardi and L. J. Else (2018). "Development, validation and utilization of a highly sensitive LC-MS/MS method for quantification of levonorgestrel released from a subdermal implant in human plasma." J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci **1084**: 106-112.

COFEPRIS (2013). NORMA Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013, Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los Terceros Autorizados que realicen las pruebas de intercambiabilidad. Requisitos para realizar los estudios de biocomparabilidad. Requisitos a que deben sujetarse los Terceros Autorizados, Centros de Investigación o Instituciones Hospitalarias que realicen las pruebas de biocomparabilidad. S. D. SALUD, DIARIO OFICIAL DE LA FEDERACIÓN.

Cui, W., Q. Liu, S. Xiong and L. Qiao (2018). "LC-MS/MS Method for Simultaneous Quantification of Dexmedetomidine, Dezocine, and Midazolam in Rat Plasma and Its Application to Their Pharmacokinetic Study." J Anal Methods Chem **2018**: 3184759.

EMA (2012). Guideline on bioanalytical method validation C. f. M. P. f. H. U. (CHMP). London E14 4HB, United Kingdom European Medicines Agency.

FDA (2018). Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry. U. S. D. o. H. a. H. S. F. a. D. Administration. 10001 New Hampshire Ave., Hillandale Bldg., 4th Floor Silver Spring, MD 20993-0002, Office of Communications, Division of Drug Information Center for Drug Evaluation and Research Food and Drug Administration

Kadian, N., K. S. Raju, M. Rashid, M. Y. Malik, I. Taneja and M. Wahajuddin (2016). "Comparative assessment of bioanalytical method validation guidelines for pharmaceutical industry." J Pharm Biomed Anal **126**: 83-97.

Kaur Harpreet, S. G., Seth Nimrata and Rayat (2013). "PHARMACEUTICAL PROCESS VALIDATION: A REVIEW Kaur." Journal of Drug Delivery & Therapeutics **3(4)**: 189-194.

Keyur B. Ahir, K. D. S., Sushma P. Yadav, Hetal S. Patel, Chetan B. Poyahari (2014). "Overview of Validation and Basic Concepts of Process Validation." Scholars Academic Journal of Pharmacy (SAJP) **3(2)**: 178-190.

Kollipara, S., G. Bende, N. Agarwal, B. Varshney and J. Paliwal (2011). "International Guidelines for Bioanalytical Method Validation: A Comparison and Discussion on Current Scenario." Chromatographia **73(3-4)**: 201-217.

Lawrence X. Yu, B. V. L. i. (2014). FDA Bioequivalence Standards. Silver Spring, MD, USA, Springer.

Lowes, M. L. R. J. S. (2017). Regulated Bioanalysis: Fundamentals and Practice. Gewerbestrasse 11, 6330 Cham, Switzerland, Springer.

MHLW (2013). Draft Guideline on Bioanalytical Method Validation in Pharmaceutical Development Japan, Ministry of Health, Labour and Welfare.

Popowicz, N. D., S. J. O'Halloran, D. Fitzgerald, Y. C. G. Lee and D. A. Joyce (2018). "A rapid, LC-MS/MS assay for quantification of piperacillin and tazobactam in human plasma and pleural fluid; application to a clinical pharmacokinetic study." J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci **1081-1082**: 58-66.

Prathipati, P. K., S. Mandal and C. J. Destache (2018). "Development and validation of LC-MS/MS method for quantification of bictegravir in human plasma and its application to an intracellular uptake study." Biomed Chromatogr: e4379.

Q. Alan X, T. L. M. (2013). LC-MS in Drug Bioanalysis. New York Heidelberg Dordrecht London, Springer.

Robert A. Nash, A. H. W. (2003). Pharmaceutical Process Validation. 270 Madison Avenue, New York, NY 10016.

Tijare, L. K., R. Nt and M. Un (2016). "A Review on Bioanalytical Method Development and Validation." Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research **9**(9).

V Sonawane, L. (2014). "Bioanalytical Method Validation and Its Pharmaceutical Application- A Review." Pharmaceutica Analytica Acta **05**(03).

Wenkui Li, J. Z., Francis L.S. Tse (2013). HANDBOOK OF LC-MS BIOANALYSIS, Best Practices, Experimental Protocols, and Regulations. Hoboken, New Jersey. United States of America.

WHO (1996). WHO EXPERT COMMITTEE ON SPECIFICATIONS FOR PHARMACEUTICAL PREPARATION. WHO TECHNICAL REPORT SERIES. WHO. Switzerland. **34**.



## **MAESTRÍA EN INVESTIGACIÓN CLÍNICA**

**VALIDACIÓN DE MÉTODOS BIOANALÍTICOS CROMATOGRÁFICOS PARA  
FÁRMACOS: LEGISLACIÓN NACIONAL E INTERNACIONAL Y SU  
APLICACIÓN EN ESTUDIOS DE BIOEQUIVALENCIA, FARMACOCINÉTICA  
Y TOXICOCINÉTICA**

**L.F. Alan Orlando Baranda Gómez**

Directora de Tesis: Dra. en C. Ana Laura Márquez Aguirre

Co-Director de Tesis: Dra. en C. Tanya Amanda Camacho Villegas

Asesor: Dra. en C. Erika Nahomy Marino Marmolejo

GUADALAJARA, JALISCO, ENERO, 2019.