



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Ciencias Químicas

- Validación de Métodos Analíticos -

TESINA

que para obtener el Título de

QUIMICO FARMACOBIOLOGO

presenta

María del Refugio Flores Mendoza

Querétaro, Qro., 1995.

FACULTAD DE
QUIMICA



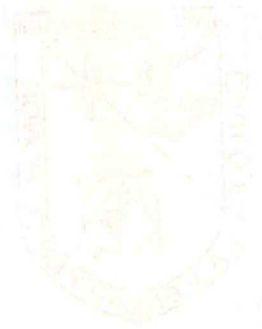
BIBLOTECA

No. Adq. LS 0742

No. Titulo _____

Clas. S43.08

F 634v

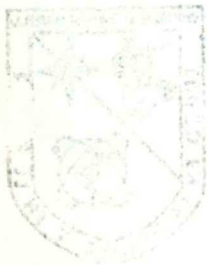


Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Ciencias Químicas

Verificación de Métodos Bacteriológicos

UNIVERSIDAD DEL PACIFICO
QUERETARO



BIBLIOTECA

QUERETARO

que se obtiene el título de

QUINTO ESPECIALIDAD

Presenta

Maria del Refugio Flores Montoya

Querétaro, Qro. 1995

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

CARRERA DE QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

TESINA TEÓRICA

VÁLIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

MARÍA DEL REFUGIO FLORES MENDOZA

ASESORES:

**Q. B. SERGIO PACHECO HERNÁNDEZ
Q. B. PATRICIA VILLALOBOS AGUILERA**

SINODAL:

Q. B. MA. DE LOS ÁNGELES ESCAMILLA NAVARRO.

DEDICATORIA

A mis padres y hermanos por creer en mí,

brindarme su ayuda, confianza y motivarme

cada día a lo largo de toda la carrera.

A mis compañeros y amigos por su amistad

y los momentos compartidos.

A las personas que siempre me motivaron

a seguir adelante para poder llegar al término.

A todos ellos quiero darles las gracias.

María del Refugio Flores Mendoza.

ÍNDICE

Resumen

I. Introducción	1
II. Terminología	15
III. Objetivos	21
IV. Justificación	23
V. Metodología	25
1. Exactitud y repetibilidad al 100 %	28
2. Linearidad del sistema de medición	30
3. Linearidad del método de medición	39
4. Precisión del sistema de medición	46
5. Precisión del método de medición	46
a) Bajo las mismas condiciones (repetibilidad)	
b) Bajo diferentes condiciones (reproducibilidad)	
6. Límite de detección de un método analítico	48
7. Estabilidad de una muestra	56
8. Especificidad de una muestra	64
9. Referencias Bibliográficas	70

RESUMEN

En este trabajo se pretende dar a conocer la importancia que tiene en la actualidad la validación de métodos analíticos, por lo cual se da una introducción en la que se habla del porque es importante que cualquier método sea validado.

A continuación se muestran los factores de variación en el desarrollo de métodos analíticos. Los tipos de errores que podemos tener al realizar un método, así como su evaluación para poder determinar la exactitud y establecer la precisión de un método analítico.

La etapa de validación comprende una serie de pruebas sistemáticas por las que queda establecido de manera clara y objetiva, que el método en estudio reúne los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas. De tal manera que el proceso de validación de un método en particular está basado en principios científicos adecuados y ha sido optimizado para propósitos de medición.

También se cuenta con la definición de algunos términos utilizados así como la descripción de los objetivos planteados y la justificación de este trabajo.

Por último se da la definición, procedimiento, cálculos, criterios a seguir y para una mayor asimilación se muestra un ejemplo de cada uno de los parámetros: exactitud, linealidad, precisión (repetibilidad y reproducibilidad), estabilidad, especificidad y límite de detección del método analítico.

I. INTRODUCCION

En los últimos años la validación de métodos analíticos ha adquirido gran importancia, por ello, es necesario realizar comentarios tomando como base sus antecedentes, la importancia, los aspectos regulatorios actuales, su aplicación y los recursos necesarios para llevarla a cabo.

En la década de los 40's, en alguna revista del área farmacéutica, se hace referencia a algunos parámetros importantes de la validación de métodos analíticos y en la de los 60's fue introducida a nuestro país. En la actualidad se han desarrollado una serie de procedimientos que permiten validar al método, como un aspecto importante en la filosofía de cualquier sistema de calidad en una empresa: "ASEGURAR LA CALIDAD DE UN PRODUCTO". El término validación hace su aparición como un movimiento más de la actividad de la calidad, tomando como idea su principio, se puede establecer que la validación de métodos analíticos es un proceso documentado que permite demostrar que éste cumple con su propósito; por tanto, la importancia de esta actividad reside en determinar la confiabilidad de la metodología. Ante una diversidad de técnicas extractivas, separativas, instrumentales, etc. podemos hablar de una cantidad ilimitada de metodología al alcance del analista, para resolver el problema de medición analítica, aparte de los métodos oficiales existentes. Pero uno de los problemas con los que se enfrenta éste, es establecer su confiabilidad ya que existen una serie de procedimientos que permiten demostrar la confiabilidad de un método. Varios autores, instituciones y grupos de trabajo han planteado ciertos requisitos, en función del propósito del método, que en ocasiones llegan a confundir al analista. Debido a esto, en distintos foros se han manejado varios lineamientos mínimos. Un avance importante como base regulatoria la podemos encontrar en la USP XXII y en la ley General de Salud, está última menciona que el control de calidad aplicado a cualquier preparado farmacéutico debe de comprobarse y validar cualquier técnica empleada para este fin. Con esta regulación, las autoridades sanitarias y del sector salud exigen la validación de métodos analíticos. Es importante mencionar que el proceso de validación debe ser aplicado a métodos oficiales, y no por esto olvidemos que éstos deben estar bajo control. Para llevar a cabo este proceso, se necesita contar con recursos físicos y principalmente humanos. Si se revisaran los planes de estudio de los farmacéuticos a nivel nacional, contaríamos con pocas instituciones que preparan al egresado en esta área; por ello, la empresa ha de capacitar a su personal para el desarrollo de esta actividad. Entre las habilidades importantes para determinar el recurso a capacitar, se pueden mencionar: la experiencia del área de análisis, conocimientos de estadística que le permiten

interpretar la información generada en el proceso de validación, sentido común en la toma de decisiones en base a la interpretación estadística: experiencia analítica y capacidad administrativa para organizar, planear, programar y documentar esta actividad. (Alcántara P. 1990).

El Colegio de Químicos Farmacéuticos Biólogos, preocupados por la necesidad de manejar criterios uniformes, tanto para llevar a cabo este tipo de estudios como para presentarlos a las autoridades sanitarias, reunió a un grupo de responsables de los departamentos de Desarrollo Farmacéutico y Control de Calidad de la industria y a profesores universitarios, con objeto de conocer los diferentes puntos de vista que se utilizaban para la validación de las técnicas analíticas en los laboratorios farmacéuticos y, al mismo tiempo, lo que se estaba enseñando en las universidades.

Al comprobar que existía, por un lado, una gran diversidad de criterios que se estaban utilizando y la poca importancia que se le estaba prestando a esta actividad, por otro lado la falta de una guía oficial por parte de las autoridades el Colegio se fijó el objetivo de tratar de uniformizar los procedimientos para llevar a cabo la validación de la metodología analítica, tratando de hacerlo de una manera sencilla, adecuada y principalmente, que proporcionara información útil y confiable tanto al profesionista como las autoridades responsables del registro y control de medicamentos.

El propósito principal de contar con esta guía es unificar criterios entre los profesionistas y técnicos que tienen bajo su cargo esta responsabilidad en la Industria, Centros de enseñanza y Autoridades con objeto de hacer más fácil y productivo el trabajo de todos los que, de alguna manera estamos involucrados en este tipo de actividades. (Castañeda P, 1990).

Con el desarrollo del comercio los pequeños distribuidores proliferaron, apareciendo intermediarios entre el fabricante y el usuario y las mercancías empezaron a moverse de una ciudad a otra.

Entonces surgió la necesidad de especificaciones, muestras, garantías y otros medios para proveer el equivalente al contacto, frente a frente, entre consumidor y fabricante. Estas necesidades fueron cubiertas en las diferentes sociedades mediante diferentes formas de organización y son de particular interés en el establecimiento de los estándares de calidad.

Las crecientes necesidades de las sociedades crearon sistemas complejos de producción. El diseño, construcción, prueba, operación y mantenimiento de tales sistemas presentan nuevos problemas en aspectos de calidad (precisión, confiabilidad, variabilidad, etc.). Dado que los sistemas de gran complejidad fueron básicamente desarrollados durante el siglo XX, la solución para los problemas de calidad que con ellos surgieron, no es de ninguna manera completa.

En diversos intentos por mejorar la calidad y economía de los procesos las décadas pasadas han visto emerger varios movimientos:

1.- Control Estadístico de Calidad. Aparece en 1924 con la creación de cartas de control; este movimiento enfatiza la aplicación de métodos estadísticos a los problemas de manufactura.

2. Control Total de la Calidad. Este movimiento surgió en los cincuentas. Proponen que el programa de control de calidad debe ser apropiado en alcance e incluir el control de nuevos diseños, de materiales recibidos, de productos y estudios especiales de proceso, así como una serie de medidas diseñadas para prevenir o eliminar errores en todas las etapas de la producción.

3. Confiabilidad. Movimiento desarrollado a mediados de los 50's, señala el énfasis que debe hacerse del problema de la calidad en la fase de diseño del producto.

4. Efectividad del Producto. Este movimiento que apareció en los 60's, está asociado con productos complejos e indica que la confiabilidad del producto debe ser suplementada por mantenimiento de uso, productividad, prueba de usuario, costo, etc.

5. Cero defectos. Movimiento emergido en los 60's enfatiza los aspectos motivacionales hacia la calidad en la fase de manufactura.

En 1906 el acta de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos indicaba que tanto los productos como la obtención de materias primas deberían tomarse las medidas necesarias para prevenir adulteraciones. En 1938 el Acta de Alimentos, Fármacos y Cosméticos de EUA, exigía la certeza de la seguridad de los medicamentos producidos.

En 1985, la Academia Nacional de Ciencias Farmacéuticas, la Asociación Farmacéutica Mexicana, el Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos de México, Producción Química-Farmacéutica y la Cámara Nacional de la Industria Farmacéutica, formaron una comisión Interinstitucional, abocando el estudio de los procedimientos de las Prácticas Adecuadas de Manufactura Farmacéutica directamente aplicados a la situación industrial prevaleciente en México.

En la última década han surgido exigencias crecientes en la fabricación y control de medicamentos.

Así, mediante el empleo de técnicas matemáticas con una sólida base teórica se puede optimizar el diseño de nuevos productos químicos, la producción en masa y el control de los procesos productivos, utilizando el método científico y no el método artesanal, hasta hace poco se había caracterizado como la forma más usual de trabajo en el campo de la tecnología farmacéutica.

Aunado a esto, el progreso de la tecnología ha provocado la invención de instrumentos y aparatos cada día más eficientes y precisos, que han sustituido a la materia voluminosa generalmente de operación manual cuyo funcionamiento y manejo requería de un alto grado de supervisión.

El diseño de un producto se realiza, empleando principios exactos y el método científico, asegurando así la interconstrucción racional de todas sus propiedades. Este diseño, debe abarcar desde la selección de las materias primas, materiales de empaque y métodos productivos, así como las técnicas de control de materiales, producto y proceso, siendo esto de gran importancia, ya que muestra directamente el objetivo básico de todo el trabajo que se va a efectuar.

Además es imperativo que un producto pueda ser reproducido lo más cercano posible, lote tras lote, por lo que será imprescindible controlar el proceso de tal forma que efectúe de manera óptima y predecible el trabajo para el cual fue destinado. Por ello, la validez de un proceso de manufactura deberá comprobarse originalmente y verificarse de manera continua. El proceso podrá ser inicialmente concebido o sufrir una alteración significativa del mismo y en todo caso deberá dar como resultado un producto acorde a las especificaciones prescritas.

Aunque la validación, es relativamente nuevo, la literatura farmacéutica contiene ejemplos de los cuales el objetivo central es la demostración de la validez de diversos métodos de producción, de control y análisis. Las reglamentaciones concernientes a las prácticas adecuadas de manufactura de varios países contienen numerosos casos donde, aunque no por nombre se hace patente el requerimiento de validar toda técnica y operación. En muchos casos, estas reglamentaciones especifican que aún las medidas tomadas para corregir desviaciones en un proceso deben ser validadas y su efectividad debe ser evaluada; además se hace hincapié invariablemente, en la necesidad de calibrar todo equipo y mantener documentos escritos actualizados "Modus Operandi" de cada técnica involucrada directa o indirectamente en la producción y control de los medicamentos. Considerándose actualmente fuera de control todo aquel proceso que no esté validado, incluso la Administración de Fármacos y Alimentos (FDA) de Estados Unidos exige que todo proceso esté provisto por un procedimiento que haya sido previamente validado.

A fin de asegurar la calidad de un producto, se deberá tener atención cuidadosa a un número de factores que incluyen la selección de partes y de materiales de calidad, el diseño de los procesos y de los productos, el control del proceso y las pruebas del producto en proceso o terminado.

Debido a la complejidad de los productos farmacéuticos y de los equipos médicos, las pruebas por sí solas no son suficientes para asegurar la calidad del producto por varias razones. Algunas pruebas analíticas tienen sensibilidad limitada. En otros casos para demostrar que el proceso de manufactura fue correcto sería necesario de pruebas destructivas y en ocasiones todas las variaciones que pudiesen presentarse en el producto y que pudieran tener impacto en la seguridad y efectividad no son reveladas por el análisis del producto. Los principios básicos de aseguramiento de calidad tienen como meta la producción de artículos adecuados para el uso planeado. Estos principios pueden establecerse de la siguiente forma:

- a) La calidad, seguridad y efectividad deben diseñarse y construirse en el producto.
- b) La calidad no puede ser inspeccionada o analizada en el producto terminado.

- c) Cada paso del proceso de manufactura debe ser controlado para tener la máxima probabilidad de que el producto terminado cumpla con todas las especificaciones de calidad y diseño.

La validación de los procesos es un elemento clave para cerciorarnos que estas metas de aseguramiento de calidad se cumplan.

Es a través del diseño cuidadoso y de la validación, tanto de procesos como de los controles de proceso que un fabricante puede establecer un alto grado de confianza de que serán aceptables todas las unidades producidas de lotes consecutivos. La validación satisfactoria de un proceso puede reducir la dependencia de pruebas intensivas del producto terminado o en proceso. En todos los casos, los análisis de producto terminado juegan un papel principal en cerciorar que las metas de aseguramiento de calidad son alcanzadas, o sea, la validación en las pruebas de producto terminado no se excluyen mutuamente. La validación de procesos consiste en establecer la evidencia documentada que nos proporcione un alto grado de seguridad de que un proceso específico será capaz de producir consistentemente un producto con sus especificaciones y atributos de calidad predeterminados. Es importante que el fabricante prepare un protocolo de validación que especifique los procedimientos y pruebas que deberán llevarse a cabo y los datos que deberán recabarse. El propósito por el cual se obtienen los datos debe ser claro, éstos deben reflejar hechos y se deben registrar con precisión. El protocolo debe especificar número de pruebas de proceso necesarias para demostrar reproducibilidad y proporcionar una medida precisa para la variabilidad en intentos sucesivos. Las condiciones de las pruebas deberán estar cerca de los límites superior e inferior de proceso e incluir aquellas definidas anteriormente como la situación más desfavorable, esto es, que aún dentro de los procedimientos estándar de operación, tiene una mayor oportunidad de falla del producto o de proceso al compararse con las condiciones ideales. La documentación de validación deberá incluir la evidencia de la adecuabilidad de los materiales y el desempeño y confiabilidad de los equipos y sistemas.

Se deberá recobrar y documentar la información referente a las variables críticas del proceso. Mediante el análisis de los datos obtenidos se conocerá la variabilidad de los parámetros de proceso y se establecerá, afirmativa o negativamente que el equipo y los controles de proceso son o no adecuados para asegurarse que se cumplan las especificaciones de prueba. Los resultados de análisis del producto en

proceso o terminado pueden ser de gran valor en la validación de procesos, particularmente cuando pueden medirse con precisión los atributos de calidad y las variables de proceso. En donde no es posible realizar mediciones de ciertos atributos (producto terminado o en proceso), la validación de procesos deberá estar derivada principalmente de la calificación de cada sistema usado en producción y de las consideraciones de la interacción entre los diferentes sistemas. (Comité de Redacción de Guías Generales de Validación)

DESARROLLO DE UN MÉTODO ANALÍTICO

1. Bibliografía: Referencias encontradas en la literatura y otras fuentes de información.
2. Especificar si se requiere equipo especial, condiciones especiales en otros aparatos que sean de disponibilidad comercial y por supuesto, las razones de tal especificación.
3. Realizar "corridos" de pruebas, anotar resultados.
4. Describir el experimento (metodología) y proporcionar los datos para establecer la linealidad, precisión, exactitud, especificidad, etc. del mismo.
5. Señalar las posibles fuentes de error y/o imprecisión del método, precisando las medidas necesarias para eliminarlas.
6. Llevar un registro de experimentos completo del análisis.
7. Realizar comparación de métodos para contar con métodos alternativos y/o validación de interlaboratorios.

FACTORES DE VARIACIÓN EN EL DESARROLLO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

1. El material a ser analizado.
2. Los materiales, incluyendo reactivos usados en el análisis.
3. Materiales de calibración.
4. Factores ambientales.
5. Analistas
6. Instrumentos o aparatos.

FACTORES QUE AFECTAN LA CALIDAD DE LOS RESULTADOS ANALÍTICOS.

1. Cada método analítico es aplicable dentro de un rango específico de concentración .
2. La mayoría de los métodos analíticos involucrando uno o mas procedimientos de calibración de equipo de medición.
3. Es deseable que cualquier método analítico específico sea descrito en detalle en un documento oficial o semioficial.
4. Mediciones Interlaboratorios.

La validación de un método consiste en determinar la exactitud y establecer la variabilidad.

La exactitud es la concordancia absoluta entre el valor de una propiedad media experimentalmente (estimador) y su valor real de referencia (parámetro).

La precisión es la concordancia relativa entre mediciones repetidas independientemente de una misma propiedad bajo las mismas condiciones (repetibilidad) y/o bajo condiciones diferentes (reproducibilidad).

El error de un método analítico debe evaluarse para determinar la exactitud y establecer la precisión del método analítico.

Los errores se pueden dividir en tres tipos: crasos, aleatorios y sistemáticos. Los errores crasos se pueden definir como errores tan graves que no queda otra alternativa que abandonar el experimento y empezar de nuevo. Como ejemplos se podrían incluir la avería total de un instrumento, el derramamiento accidental de una muestra muy importante o descubrir que un reactivo que se suponía puro, en realidad estaba contaminado. Tales errores normalmente se reconocen con mucha facilidad. En consecuencia, en nuestro análisis sólo tenemos que distinguir con detenimiento entre los errores aleatorios y los sistemáticos.

El error aleatorio es aquel que permanece aún cuando se ha eliminado el error sistemático y da lugar a medidas imprecisas.

El error sistemático es aquel que da lugar a medidas incorrectas. Se divide en: constante o absoluto y proporcional o relativo.

Las fuentes de error sistemático pueden ser:

- Errores instrumentales
- Errores de método
- Errores operativos
- Errores personales

Errores Instrumentales: Equipo defectuoso, impurezas de reactivos, incertidumbre de la lectura; calibración defectuosa, selección inadecuada del material, balanzas mal calibradas.

Errores de método: Reacciones incompletas, efectos de precipitación simultánea o coprecipitación. Descomposición de un precipitado o residuo durante el calentamiento, reacciones laterales, solubilidad del precipitado.

Errores Operativos: Errores de manipulación por el analista, poca experiencia en el laboratorio, introducción inadvertida de materiales extraños (recipientes descubiertos), pérdida de precipitado, secado o incineración deficiente.

Errores Personales Poca percepción del color, ceguera a algunos colores, prejuicios.

Existen varios procedimientos para evaluar el error sistemático.

El recobro experimental a un porcentaje fijo permite evaluar el error sistemático constante, mientras que el recobro experimental a varias concentraciones o linealidad permite evaluar error sistemático proporcional.

Podemos hacer una mejor distinción entre los errores sistemáticos y aleatorios con el siguiente ejemplo experimental real:

Cuatro estudiantes (A-D) realizan la determinación de una solución patrón de glucosa de 100 mg./100ml. Cada uno realiza cinco réplicas del análisis y obtienen los resultados que se muestran en la tabla.

Errores sistemáticos y aleatorios

Estudiante	Resultados (mg./100ml.)	Comentario
A	100.08	Preciso pero inexacto
	100.11	
	100.09	
	100.10	
	100.12	
B	98.80	Exacto pero impreciso
	100.14	
	100.02	
	98.00	
	100.21	
C	100.19	Inexacto e impreciso
	97.90	
	96.90	
	100.05	
	97.80	
D	100.04	Exacto y preciso
	99.80	
	100.02	
	99.70	
	100.04	

Los resultados obtenidos por el estudiante A tiene dos características importantes. Primero, todos están muy próximos; todos caen entre 100.08 y 100.12 mg. En términos generales, diríamos que los resultados son altamente reproducibles.

La segunda característica distintiva es que todos son demasiado altos; en este experimento (algo inusual) conocemos de antemano la respuesta correcta: 100 mg.

Resulta evidente que han surgido dos tipos de errores completamente distintos en el experimento de este estudiante. En primer lugar existen errores aleatorios, los cuales provocan que los resultados individuales caigan a ambos lados del valor medio (en este caso 100 mg.) . Los estadísticos afirman que los errores aleatorios afectan la precisión, o reproducibilidad de un experimento. En este caso del estudiante A, queda claro que los errores aleatorios son pequeños y, por lo tanto decimos que los resultados son precisos. Sin embargo, también existen errores sistemáticos, los cuales provocan que todos los resultados sean erróneos en el mismo sentido (en este caso todos son demasiado altos). Los errores sistemáticos afectan la exactitud, es decir la proximidad al valor verdadero. En muchos experimentos, los errores aleatorios y sistemáticos no se detectan fácilmente con solo observar los resultados sino que también tienen orígenes muy distintos en cuanto a la técnica experimental y al equipo que se utiliza. El estudiante B ha obtenido resultados que se encuentran en contraposición directa con los del estudiante A. El promedio de los cinco resultados (100.01) está muy próximo al valor verdadero, de manera que podemos caracterizar los datos como exactos, sin errores sistemáticos sustanciales. Sin embargo, la variedad de los resultados es muy grande, lo que indica una precisión insatisfactoria y la presencia de errores aleatorios sustanciales.

La comparación de estos resultados con los obtenidos por el estudiante A muestra con claridad que los errores aleatorios y sistemáticos pueden ocurrir independientemente uno de otro. Esta conclusión se refuerza con los datos de los estudiantes C y D. El trabajo del estudiante C no es ni preciso (intervalo de 96.90 a 100.19mg.) ni exacto (media de 99.00). El estudiante D ha logrado a la vez resultados precisos (intervalo de 99.7 a 100.04) y exactos (media de 100.01).

Es muy importante mencionar que las palabras precisión y exactitud tienen significados completamente distintos en la teoría de los errores, mientras que se usan de manera indistinta en el lenguaje cotidiano.

Asimismo, aunque utilizamos con anterioridad la palabra reproducibilidad como una definición aproximada de la precisión, el convenio actual hace una distinción cuidadosa entre reproducibilidad y repetibilidad.

Podemos aclarar esta diferencia con una extensión del experimento anterior. Por el camino normal el estudiante A, por ejemplo realizaría las cinco medidas utilizando el mismo material y bajo las mismas condiciones de laboratorio. En tales circunstancias, la precisión medida sería la precisión dentro de rachas, esto se denomina repetitividad.

Sin embargo, suponga que por alguna razón el mismo estudiante realizó las cinco determinaciones en ocasiones diferentes. Es probable que en tales circunstancias tanto el material utilizado como las condiciones de laboratorio pudieron cambiar de una ocasión a otra. Por eso en este caso no sería sorprendente encontrar una gran variabilidad en los resultados. Este conjunto de datos reflejaría la precisión entre rachas de método, y esto es a lo que se debería asignar el término reproducibilidad. (Miller, 1993).

II. TERMINOLOGIA

Exactitud. Es la concordancia entre un determinado valor experimental y el valor aceptado de referencia.

Linealidad. Medición del grado al cual una curva de calibración analítica se aproxima a una línea recta o el grado al cual la sensibilidad es constante.

Precisión. Es el grado de concordancia entre mediciones repetidas de una misma propiedad, derivada de la desviación estándar estimada de una serie de mediciones expresada en términos de repetibilidad y reproducibilidad.

Repetibilidad. Es la precisión de un método expresado como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizada por un solo analista usando los mismos aparatos y técnicas.

Reproducibilidad. Es la precisión de un método expresada como la concordancia "accesible", entre determinaciones realizadas en el mismo y/o en diferentes laboratorios por diferentes analistas y/o utilizando diferentes equipos.

Sensitividad. Relación entre la pendiente de una curva de calibración y la variabilidad de los puntos experimentales.

Especificidad. Es el grado al cual la medición es debida solo a la substancia a ser determinada y no a "otras substancias" que puedan estar presentes en el material a ser analizado.

Especificidad en estabilidad. Es un tipo de especificidad en el cual las otras substancias son aquellas que puedan formarse durante el almacenamiento del material bajo condiciones normales o específicas de temperatura, luz y humedad.

Límite de detección. Es la menor cantidad detectable del compuesto por analizar.

Tolerancia del método. Controlar un factor del método alrededor de un nivel dado en un rango de tolerancia específico.

Modelos estadísticos Lineales: Los modelos estadísticos lineales tienen la utilidad de representar una relación lineal inicialmente hipotética, entre la variable de respuesta y el o los factores de variación.

Análisis de Varianza: Análisis estadístico, que permite establecer con base a la variación de los factores de variación, su efecto en la variable de respuesta.

MATRIZ DE TRATAMIENTOS DE UN ESTUDIO DE PRECISIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO					
ANALISTA 1			ANALISTA 2		
DÍA 1	DÍA 2	...	DÍA 1	DÍA 2	...
Valoración 1	Valoración 1	...	Valoración 1	Valoración 1	...
Valoración 2	Valoración 2	...	Valoración 2	Valoración 2	...
Valoración 3	Valoración 3	...	Valoración 3	Valoración 3	...
:	:	:	:	:	:
:	:	:	:	:	:

MODELO ESTADÍSTICO LINEAL PARA EL ESTUDIO DE PRECISIÓN

$$Y_{ijk} = M + A_i + D_{j(i)} + E_{k(ij)}$$

Y_{ijk} = recobro experimental (o valoración) asociado al k-ésimo placebo adicionado en el j-ésimo día para el i-ésimo analista.

M = Media general.

A_i = efecto del i-ésimo analista sobre el recobro experimental $i = 1 \dots a$

$D_{j(i)}$ = efecto del j-ésimo día del i-ésimo analista sobre el recobro experimental.
 $j = 1 \dots d$

$E_{k(ij)}$ = error experimental. $k = 1 \dots r$

TABLA DE ANADEVA

FUENTE DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA CUADRÁTICA	F_{crit}	EMC
A_i	$a-1$	$\frac{SY_{i..}^2 - Y^2_{...}}{dr}$	SC_A / gl_A	MC_A	$\sigma^2_E + r\sigma^2_D + rd\sigma^2_A$
$D_{i(i)}$	$(d-1)a$	$\frac{SSY^2_{ii} - SY^2_{i..}}{r}$	SC_D / gl_D	MA_D	$\sigma^2_E + r\sigma^2_D$
$E_{k(ii)}$	$(r-1)da$	$\frac{SSSY^2_{iik} - SY^2_{ii}}{r}$	SC_E / gl_E	MC_E	σ^2_E

PROCEDIMIENTO DE CÁLCULO PARA EVALUAR LA PRECISIÓN DEL MÉTODO DE MEDICIÓN

1) Tabular los resultados conforme el siguiente formato:

		A N A L I S T A	
		(i)	
		1	2
D	1	_____	_____
		_____	_____
		_____	_____
I	j(i)	_____	_____
		_____	_____
		_____	_____
A	2	_____	_____
		_____	_____
		_____	_____

2) Calcular la suma de las combinaciones: Analista - Día ($Y_{ij.}$), así como la suma para cada analista ($Y_{i..}$), y la suma total de los datos ($Y_{...}$) y la suma de cada dato elevado al cuadrado ($SSS Y_{ijk}^2$):

$$Y_{1..} =$$

$$Y_{2..} =$$

$$Y_{...} =$$

$$Y_{11.} =$$

$$Y_{12.} =$$

$$Y_{21.} =$$

$$Y_{22.} =$$

$$SSS Y_{ijk}^2 =$$

3) Calcular la suma de cuadrados del analista (SCa) con la siguiente ecuación:

$$SCa = (S Y_{i..}^2) / (d r) - (Y_{...}^2) / (d r a) =$$

Donde r = número de replicaciones

d = número de días

a = número de analistas

4) Calcular la suma de cuadrados del día anidado en el analista (SCd), por medio de la siguiente ecuación:

$$SCd = (SS Y_{ij.}^2) / r - (S Y_{i..}^2) / (r d) =$$

5) Calcular la suma de cuadrados del error (SCe), con la siguiente ecuación:

$$SCe = (SSS Y_{ijk}^2) - (SS Y_{ij.}^2) / r =$$

CONSTRUCCIÓN DE LA TABLA DE ANALISIS DE LA VARIANZA.

6) Con los datos anteriores, construir la tabla de análisis de la varianza (ANADEVA):

TABLA DE ANADEVA

FUENTE DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA CUADRÁTICA	F_{α}	F_{α}
Analista	$gla=a-1$	$SCa =$	$MC_a = \frac{SC_a}{gla}$	$Fa = \frac{MC_a}{MC_d}$	$F_{gla, gld; 0.05}$
Día	$gld=(d-1)a$	$SCd =$	$MC_d = \frac{SC_d}{gld}$	$Fd = \frac{MA_d}{-MC_d}$	$F_{gld, gle; 0.05}$
Error	$gle=(r-1)ad$	$SCe =$	$MC_e = \frac{SC_e}{gle}$		

7) Establecer las decisiones con base a las siguientes reglas:

Si $Fa \geq F_{gla, gld; 0,05}$

El método analítico no es reproducible por los analistas.

Si $Fa < F_{gla, gld; 0,05}$

El método analítico es reproducible por los analistas.

Si $Fd \geq F_{gld, gle; 0,05}$

El método analítico no es reproducible en distintos días por un mismo analista.

Si $Fd < F_{gld, gle; 0,05}$

El método analítico es reproducible en distintos días por un mismo analista.

- 8) La magnitud de la variación en el método analítico debido a los analistas, y entre los días para un mismo analista y entre los días para un mismo analista; si el método no es reproducible por los analistas y/o entre días para un mismo analista, se calcula con las siguientes ecuaciones:

$$\text{Variación interanalistas:} \quad \pm (MCa - MCd) / (r \cdot d)^{1/2}$$

$$\text{Variación interdías para analistas:} \quad \pm (MCa - MCd) / (r \cdot d)^{1/2}$$

REPETIBILIDAD DEL MÉTODO ANALÍTICO

$$\text{Repetibilidad:} \quad \pm M_{Ce}^{1/2}$$

COEFICIENTE DE VARIACIÓN TOTAL

- 10) Calcular la media aritmética total, con la siguiente ecuación:

$$\bar{y} = \frac{\sum Y_{...}}{n} =$$

Donde: $n = a \cdot d \cdot r$

- 11) Calcular la desviación estandar total, con la siguiente ecuación:

$$s = \sqrt{\frac{\sum n \sum Y_{ijk}^2 - (\sum Y_{...})^2}{n(n-1)}}^{1/2} =$$

- 12) Calcular el coeficiente de variación total (CV), con base a la siguiente ecuación:

$$CV = \frac{s}{\bar{y}} \cdot 100 =$$

PRECISIÓN DEL SISTEMA

1) Tabular los resultados.

$$y_1, y_2, y_3, \dots, y_n$$

2) Cálculos preliminares

$$\Sigma y = y_1 + y_2 + y_3 + \dots + y_n$$

$$\Sigma y^2 = y_1^2 + y_2^2 + y_3^2 + \dots + y_n^2$$

$$\bar{y} = \frac{\Sigma y}{N}$$

$$DE = \sqrt{\frac{N(\Sigma y^2) - (\Sigma y)^2}{N(N-1)}}$$

3) Cálculos finales.

Coeficiente de variación:

$$CV = \frac{DE}{\bar{y}} \times 100$$

Precisión del sistema (ejemplo)

1) Tabla de altura relativa.

$$1.185, 1.189, 1.184, 1.203, 1.198, 1.191$$
$$N = 6$$

2) Cálculos preliminares

$$\Sigma y = 1.185 + 1.189 + 1.184 + 1.203 + 1.198 + 1.191 = 7.15$$

$$\Sigma y^2 = 1.185^2 + 1.189^2 + 1.184^2 + 1.203^2 + 1.198^2 + 1.191^2 = 8.52070$$

$$DE = \left| \frac{6(8.5207) - 7.15^2}{6(5)} \right|^{1/2} = 0.00753$$

3) Cálculos finales

Coeficiente de variación

$$CV = \frac{0.00753}{1.19167} \times 100 = 0.63\%$$

Se cumple con el criterio para la precisión del sistema.

Precisión (reproducibilidad)

El siguiente procedimiento únicamente es aplicable cuando se utilicen dos días, 2 analistas y 3 determinaciones.

1. Tabular los resultados con base en el siguiente formato:

ANALISTA

		1	2
DIA	1	y_{111}	y_{211}
		y_{112}	y_{212}
		y_{113}	y_{213}
	2	y_{121}	y_{221}
		y_{122}	y_{222}
		y_{123}	y_{223}

2. Cálculos preliminares:

$$y \dots = y_{111} + y_{112} + y_{113} + y_{121} + y_{122} + y_{123} + y_{211} + y_{212} + y_{213} + y_{221} + y_{222} + y_{223}$$

$$\Sigma y^2 \dots = y_{111}^2 + y_{112}^2 + y_{113}^2 + y_{121}^2 + y_{122}^2 + y_{123}^2 + y_{211}^2 + y_{212}^2 + y_{213}^2 + y_{221}^2 + y_{222}^2 + y_{223}^2$$

$$\bar{y} = Y \dots / N$$

$$DE = \left| \frac{N (\Sigma y)^2 - (y \dots)^2}{N(N-1)} \right|^{1/2}$$

N = número total de determinaciones (en este caso específico N = 12).

3. Cálculos Finales:

Coeficiente de variación

$$CV = (DE / \bar{y}) \cdot 100$$

Precisión : Reproducibilidad (ejemplo)

1) Tabla de resultados (Método Cromatográfico)

		ANALISTA	
		1	2
DIA	1	$y_{111} = 99.86$	$y_{211} = 100.60$
		$y_{112} = 100.38$	$y_{212} = 101.20$
		$y_{113} = 99.62$	$y_{213} = 100.87$
	2	$y_{121} = 100.25$	$y_{221} = 100.33$
		$y_{122} = 99.99$	$y_{222} = 100.77$
		$y_{123} = 99.36$	$y_{223} = 100.07$

$$N = 12$$

2) Cálculos preliminares.

$$Y \dots = 99.86 + 100.38 + 99.62 + 100.25 + 99.99 + 99.36 + 100.6 + 101.2 + 100.6 + 101.2 + 100.87 + 100.33 + 100.77 + 100.07 = 1203.3$$

$$\Sigma y^2 = 99.86^2 + 100.38^2 + 99.62^2 + 100.25^2 + 99.99^2 + 99.36^2 + 100.6^2 + 101.2^2 + 100.87^2 + 100.33^2 + 100.77^2 + 100.07^2 = 120664.0442$$

$$\bar{Y} = \frac{1203.3}{12} = 100.275$$

$$DE = \sqrt{\frac{12 (120664.0442) - 1203^2}{12 (12 - 1)}}^{1/2} = 0.5340$$

3) Cálculo final.

Coefficiente de variación.

$$CV = \frac{0.5340}{100.275} \times 100 = 0.5325$$

Como $CV < 2\%$ se cumple con el criterio para métodos cromatográficos.

LIMITE DE DETECCIÓN

Definición:

Es la mínima concentración de una sustancia en una muestra la cual puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, bajo las condiciones de operación establecidas.

Determinación:

Si se desea determinar el límite de detección del sistema de medición se aplica el siguiente procedimiento. Se evalúa la respuesta de la sustancia de interés, como mínimo a 3 diluciones por triplicado a concentraciones bajas, partiendo de una misma solución patrón y determinando la respuesta de 5 blancos preparados de manera independiente. La determinación se efectúa por un mismo analista, bajo las mismas condiciones de operación. Si se desea determinar el límite de detección del método de medición se aplica el siguiente procedimiento. Se evalúa la cantidad recuperada de la sustancia de interés, como mínimo a 3 cantidades adicionadas por triplicado, y determinando la respuesta de 5 placebos preparados de manera independiente. La determinación se efectúa por un mismo analista, bajo las mismas condiciones de operación.

Criterio:

El límite de detección debe de satisfacer el requisito para el fin de empleo del sistema de medición o del método de medición.

ESTABILIDAD ANALÍTICA DE LA MUESTRA

Definición: Son las condiciones en las cuales la muestra mantiene constante su propiedad medible en un lapso determinado.

Determinación: Se determina mediante el análisis, por triplicado, de una muestra homogénea analizada de manera independiente. Almacenar las muestras analizadas bajo distintas condiciones (ej. temperatura ambiente, refrigeración, protegidas de la luz, etc.) durante un tiempo preestablecido por el analista. Reanalizar las muestras bajo las mismas condiciones de operación utilizando una solución patrón preparada recientemente, para cada tiempo, de acuerdo a lo establecido en el método analítico. La determinación debe ser efectuada por un mismo analista.

Criterio: La muestra es estable si el IC para la diferencia de la media de la muestra con respecto a la media del análisis inicial incluye el valor de cero y/o la magnitud del efecto no exceda los siguientes porcentajes:

Cromatográficos	$\pm 2\%$
Titrimétricos	$\pm 2\%$
Químicos y espectrofotométricos	$\pm 3\%$
Microbiológicos	$\pm 5\%$

Estabilidad de la muestra analítica

1. Tabular los resultados con base al siguiente formato y calcular los resultados indicados:

	CONDICIÓN TIEMPO		
INICIAL	1	2	m
Y ₁	Y ₄	Y ₇	Y _{n-2}
Y ₂	Y ₅	Y ₈	Y _{n-1}
Y ₃	Y ₆	Y ₉	Y _n

2. Cálculos preliminares para el intervalo de confianza:

MEDIA	\bar{Y}_0	\bar{Y}_1	\bar{Y}_2	\bar{Y}_m
VARIANZA	$(S_0)^2$	$(S_1)^2$	$(S_2)^2$	$(S_m)^2$

Varianza ponderada:

$$Sp_1^2 = \frac{2(S_0)^2 + 2(S_1)^2}{2(c+1)}$$

$$Sp_2^2 = \frac{2(S_0)^2 + 2(S_2)^2}{2(C+1)}$$

$$Sp_m^2 = \frac{2(S_0)^2 + 2(S_m)^2}{2(c+1)}$$

3. Cálculos finales para el intervalo de confianza:
para cada condición x tiempo:

$$IC = (\bar{Y}_i - \bar{Y}_0) \pm t^* \times [Sp_i^2 (2/3)]^{1/2}$$

Donde:

t^* = valor de la t de Dunnet con c comparaciones y $2(c+1)$ grados de libertad y una probabilidad acumulada de 0.975.

4. Cálculos preliminares para el coeficiente de variación: para cada condición/tiempo/muestra calcular el factor (I) con la siguiente fórmula:

$$I = \frac{(\text{análisis muestra/condición/tiempo})_i}{(\text{análisis inicial})_j} \times 100$$

$$I_1 = (Y_4/Y_1) \times 100$$

$$I_2 = (Y_5/Y_2) \times 100$$

$$I_3 = (Y_6/Y_3) \times 100$$

$$I_4 = (Y_7/Y_1) \times 100$$

$$I_5 = (Y_8/Y_2) \times 100$$

$$I_6 = (Y_9/Y_3) \times 100$$

$$I_7 = (Y_{n-2}/Y_1) \times 100$$

$$I_8 = (Y_{n-1}/Y_2) \times 100$$

$$I_9 = (Y_n/Y_3) \times 100$$

Para cada condición/tiempo calcular la media del factor (I) con la siguiente fórmula:

$$\bar{I} = \frac{\sum I (\text{condición/tiempo})}{N}$$

donde:

N = número de muestras por cada condición/tiempo

$$I_1 = \frac{I_1 + I_2 + I_3}{3}$$

$$I_2 = \frac{I_4 + I_5 + I_6}{3}$$

$$I_3 = \frac{I_7 + I_8 + I_9}{3}$$

La media del factor (I) para cada condición/tiempo deberá cumplir con los siguientes criterios:

MÉTODO	VALOR DE \bar{I}
Cromatográficos	98 - 102%
Titrimétricos	98 - 102%
Químicos y espectrofotométricos	97 - 103%
Microbiológicos	95 - 105%

Estabilidad de la muestra analítica (ejemplo)

Se determinó la estabilidad de la muestra de análisis de Ribavirina tabletas por cromatografía de líquidos de alta resolución, reanalizando las muestras almacenadas a temperatura ambiente/24 hrs, temperatura ambiente/72 hrs y refrigeración/24 hrs utilizando una solución de referencia recientemente preparada a cada tiempo de reanálisis, las determinaciones se efectuaron por un mismo analista.

1. Tabular los resultados:

CONDICION TIEMPO

INICIAL	T.A./24 HRS	T.A./72HRS	REFRIGERACION/24 HRS
97.79	97.72	97.80	97.32
98.73	98.68	99.94	97.53
97.11	98.14	99.57	98.82

2. Cálculos preliminares para el intervalo de confianza:

$$\text{MEDIA } Y_0 = 97.8767 \quad Y_1 = 98.1800 \quad Y_2 = 99.1033 \quad Y_3 = 97.8900$$

$$\text{VARIANZA } S_0^2 = 0.6617 \quad S_1^2 = 0.2316 \quad S_2^2 = 1.3082 \quad S_3^2 = 0.6597$$

Varianzas Ponderadas:

$$Sp_1^2 = \frac{2(0.6617) + 2(0.2316)}{2(2+1)} = \frac{1.7866}{6} = 0.2978$$

$$Sp_2^2 = \frac{2(0.6617) + 2(1.3082)}{2(2+1)} = \frac{3.9398}{6} = 0.6566$$

$$Sp_3^2 = \frac{2(0.6617) + 2(0.6597)}{2(2+1)} = \frac{2.6428}{6} = 0.4405$$

3. Cálculos finales para el intervalo de confianza:

Para T.A./ 24 hrs

$$IC = (98.1800 - 97.8767) \pm 2.86 \{0.2978 [2/3]\}^{1/2}$$

$$IC = -0.9710 \text{ a } 1.5776$$

La muestra es estable a condiciones ambientales por 24 hrs, ya que en el IC se incluye el valor de cero.

Para T:A/72 hrs.

$$IC = (99.1033 - 97.8767) \pm 2.86 \{0.6566 (2/3)\}^{1/2}$$

$$IC = -0.6656 \text{ a } 3.1188$$

La muestra es estable a condiciones ambientes por 72 hrs, ya que en el IC se incluye el de cero.

Para refrigeración / 24 has

$$ICE = (97.8900 - 97.8767) \pm 2.86 \{0.4405 (2/3)\}^{1/2}$$

$$ICE = -1.5366 \text{ a } 1.5632$$

La muestra es estable en condiciones de refrigeración por 24 has, ya que en el ICE se incluye el valor de cero.

4. Cálculos preliminares para el factor (I):

Para T. / 24 has.

$$I_1 = \frac{97.72}{97.79} \times 100 = 99.93$$

$$I_2 = \frac{98.68}{98.73} \times 100 = 99.95\%$$

$$I_3 = \frac{98.14}{97.11} \times 100 = 1011.06\%$$

$$\bar{I} = \frac{101.01 + 99.95 + 101.06}{3} = 101.31\%$$

La muestra es estable a condiciones ambientales por 24 has, ya que el valor de la media para el factor I se encuentra entre 98 - 102%

Para T. / 72 has

$$I_4 = \frac{97.80}{97.79} \times 100 = 100.01\%$$

$$I_5 = \frac{99.94}{98.73} \times 100 = 101.23\%$$

$$I_6 = \frac{99.57}{97.11} \times 100 = 102.53\%$$

$$\bar{I} = \frac{101.01 + 101.23 + 102.53}{3} = 101.26\%$$

La muestra es estable a condiciones ambientales por 72 hrs, ya que el valor de la media para el factor I se encuentra entre 98 - 102%.

Para Refrigeración/24 hrs.

$$I_7 = \frac{97.32}{97.79} \times 100 = 99.52\%$$

$$I_8 = \frac{97.53}{98.73} \times 100 = 98.79\%$$

$$I_9 = \frac{98.82}{97.11} \times 100 = 101.76\%$$

$$\bar{I} = \frac{99.52 + 98.79 + 101.76}{3} = 100.02\%$$

La muestra es estable en condiciones de refrigeración por 24 hrs, ya que el valor de la media para el factor I se encuentra entre 98-102 %.

ESPECIFICIDAD

Definición: Es la medida del grado de interferencia (o ausencia de), en el análisis de mezclas complejas. Es la habilidad de un método analítico para obtener una respuesta debida únicamente a la substancia de interés y no a otro componente de la muestra.

Determinación de especificidad para métodos de control de calidad: Analizar placebos del producto con el método de medición y si es posible adicionar al placebo substancias relacionadas (precursores de síntesis, posibles contaminantes de la síntesis, entre otras) así como substancias auxiliares que se sospeche puedan estar presentes durante la manufactura del producto.

Criterio: El método no debe de responder a los placebos y su respuesta debe ser únicamente debida a la sustancia de interés.

Determinación de especificidad para métodos indicadores de estabilidad: Analizar con el método de medición, placebos adicionados con posibles productos de degradación o placebos envejecidos adicionados de posibles productos de degradación

Nota: Se sugiere que la degradación sea tal que la concentración de la sustancia de interés esté disminuida de 10 a 25% con respecto al 100% de la fórmula unitaria.

Se sugieren los siguientes métodos para degradar la sustancia; la persona que efectúe el estudio deberá escoger, aquel que de acuerdo a las propiedades fisicoquímicas del compuesto, sea el más adecuado, u otro, si así lo considera pertinente.

1. Colocar la sustancia de interés, el placebo y muestras del lote del producto en un horno a 70· C - 120· C o a 20· C menos que el punto de fusión de la sustancia de interés durante un apropiado número de días (2 a 4 semanas).
2. Exponer la sustancia de interés, el placebo y muestras del lote del producto a la luz UV o a la luz fluorescente y/o a humedad.
3. Si es necesario hacer soluciones de la sustancia de interés ajustando el pH a 1-2 y/o a 10-12 y colocarlas a 60·C -80· C durante un tiempo apropiado.

4. Si se trata de formas farmacéuticas líquidas o semisólidas pueden degradarse por oxidación (con peróxido de hidrógeno) y permanecer 2-4 semanas a temperatura ambiente; y/o por hidrólisis (pH 1-2 y 10-12), colocando las muestras a 60·C - 80·C durante un tiempo apropiado.

5. Detectar la aparición de productos de degradación, utilizando por lo menos cualquiera de las técnicas cromatográficas siguientes: cromatografía de líquidos de alta presión, cromatografía de gases o cromatografía en capa fina.

Criterio: Verificar que la respuesta del método de medición sea debido únicamente a la sustancia de interés.

Tolerancia: La tolerancia de un método analítico es el grado de reproducibilidad de los resultados analíticos obtenidos por el análisis de la misma muestra bajo modificaciones de las condiciones normales de operación, tales como diferentes temperaturas, lotes de reactivos, columnas, sistemas de elución, tipos de empaque (soporte, fase estacionaria, etc.), condiciones ambientales, etc.

(Alcántara A. 1992)

(Castañeda P.)

(Wayne W. 1991)

REFERENCIAS

- 1.- Aguilar Graciela. ¿Qué tanto sabe usted acerca de Métodos Analíticos?, Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas. Vol. 2, No.2, Octubre-Noviembre 1991.
- 2.- Alcántara A. Material de Apoyo para el Seminario de Validación de Procesos. Calibración. Validación de Métodos Analíticos. Noviembre 1992, págs. 1-8,35
- 3.- Alcántara Pineda Alejandro. Desarrollo y Validación de Métodos Analíticos. Phama News. Vol 2, No. 4, págs 19-21, Octubre 1990.
- 4.- Barrón A. Desarrollo y Validación de un Método Indicativo de Estabilidad, por Clar para determinación de clorhidrato de trihexifenidilo en tabletas y comparación con un método rutinario de control de calidad. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas. Vol 22, No.2, Junio-Julio 1991, pags 31-33.
- 5.- Castañeda Pedro. Comité de Elaboración de Guías Oficiales de Validación de la Dirección General de Control de Insumos para la Salud, SSA. Asociación Farmacéutica Mexicana. Págs. 1-73.
- 6.- Comité de Redacción de Guías Generales de Validación. Págs 1-6.
- 7.- Cruz Medina Roberto. Trabajo de Investigación. Algunos Aspectos Estadísticos relacionados con la precisión de los Análisis Químicos. Rev. Soc. Quím. Mex. Vol. 36, No. 5 1992.
- 8.- Garay D. Cristian. Química Analítica. Limusa, Cap. 4 Primera Edición 1981, México. Págs 65-67.
- 9.- Jiménez Vargas Enrique. Un acercamiento a la Validación de Métodos Analíticos. Primera parte. Phama News. Vol 1, No. 5, págs, 5-7.
- 10.- Méndez Ramírez Ignacio. El protocolo de Investigación. Lineamientos para la elaboración y análisis. Trillas Junio 1987. Págs 124-125.

- 11.- Miller J. C. Estadística para Química Analítica. Segunda Edición. Addison Wesley Iberoamericana 1993. Págs 2-10.
- 12.- Sánchez Ruiz Juan Francisco. Validación de Métodos Analíticos en Química Clínica. Noviembre 1991.
- 13.- Us Pharmacopea National Formulari USPP XXII. 1990. Estados Unidos 22 ava Revisión.
- 14.- Villafuerte R. L. Calificación de personal para el control óptico de ampollitas. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas. Vol 22, No. 1. Abril-Junio 1991. Págs 22-25.
- 15.- Wayne W. Daniel. Bioestadística. Base para el Análisis de las Ciencias de la Salud. Limusa, 3ª Edición. 6ª Reimpresión. México 1991. Págs. 37-43.

Estabilidad de la muestra. Demostrar que no hay descomposición en los solventes que se ocupen.

Intervalo. El intervalo de un método analítico está definido por las concentraciones comprendidas entre los niveles de concentración superior e inferior de la sustancia incluyendo estos niveles, en el cual se ha demostrado que el método es preciso, exacto, y lineal.

Recobro. Se le llama recobro a la cantidad recuperada cuando se analizan placebos cargados con cantidades conocidas de la sustancia de interés, con el método analítico propuesto.

Grados de libertad. Es el número de formas en que una serie de cifras pueden variar independientemente.

Calibración. Es el método científico que se usa para demostrar la precisión, reproducibilidad y exactitud de cualquier instrumento de medición de variables.

Certificación. Es el método científico, que empleando técnicas de ingeniería permite demostrar que un equipo o instalación física cumple satisfactoriamente los requerimientos mínimos establecidos por el fabricante con el objeto de garantizar la reproducibilidad y efectividad de la operación del equipo o instalación física de referencia.

Cantidad mínima cuantificable. Es la mínima cantidad a la que el método analítico es lo suficientemente preciso para producir un estimado satisfactorio de una concentración desconocida.

Cantidad máxima cuantificable. La concentración donde la sensibilidad comienza a cambiar, por ejemplo, la función de la curva de calibración no es lineal.

Límites. Valores externos permitidos para la variación de una característica.

Especificaciones. Son aquellos documentos que contienen información básica descriptiva de los requerimientos que debe cumplir la materia prima, material de empaque y empaque, equipos o producto en cuestión.

Calificación. Parte del programa de validación en donde el control de los parámetros físicos de un sistema es evaluado para demostrar su eficacia.

Substancia patrón de referencia. Substancia patrón del analito certificado de acuerdo a normas oficiales.

Blanco o placebo Adicionado. Blanco o placebo preparado a una cantidad equivalente a la del producto, adicionado de concentraciones variables de la substancia patrón de referencia dentro de un intervalo de concentración especificado.

Validación. Programa formal para demostrar que un producto específico puede ser producido confiablemente por el proceso diseñado.

El Comité de Redacción de Guías Generales de Validación define a la validación como el método científico que proporciona la evidencia documentada para demostrar la confiabilidad, reproducibilidad y efectividad de cualquier instrumento de medición de variables.

La **FIF** (Federación Internacional Farmacéutica) define el proceso de validación como la evaluación de procesos productivos por medios sistemáticos, para demostrar si este es confiable y reproducible.

La **FDA** (Food and Drug Administration) define el proceso de validación como un programa documentado que provee un alto grado de seguridad de que un proceso específico producirá constantemente un producto, dentro de sus especificaciones y atributos de calidad predeterminadas. (Villafuerte R, 1991).

La validación del método puede definirse como el proceso por el cual queda establecido por estudios de laboratorio que la capacidad del método satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas.

Un método válido es aquel cuya exactitud es conocida y establecida la variabilidad del mismo.

- * Conocer su variación
- * Identificar las posibles interferencias
- * Conocer su especificidad
- * Establecer su precisión
- * Ser de sensibilidad adecuada

EXPERIMENTOS MÍNIMOS PARA ESTABLECER LA VALIDEZ DE UN MÉTODO ANALÍTICO

- * Linearidad
- * Sensibilidad
- * Especificidad
- * Exactitud
- * Reproducibilidad (Precisión)

DOCUMENTACIÓN

1. Procedimiento del método de prueba detallado
2. Datos de exactitud, precisión, linealidad, especificidad, límite de detección.
3. Señalar los parámetros claves a controlar.
4. Anexar cromatogramas que demuestren la especificidad del método
5. Documentar el efecto obtenido al validar una condición de operación crítica.

(U. S. Pharmacopea National Formulary 1990)

(Aguilar G. 1991)

III. OBJETIVOS

Objetivo General: Presentar una guía para realizar la validación de un método analítico, indicando en forma clara cada paso.

Objetivos Particulares:

1. Determinar la exactitud de un método analítico
2. Determinar la linealidad del sistema de medición
3. Determinar la linealidad del método de medición
4. Determinar la precisión del sistema de medición
5. Determinar la precisión del método de medición
 - a) Bajo las mismas condiciones (repetibilidad)
 - b) Bajo diferentes condiciones (reproducibilidad)
6. Calcular el límite de detección del método analítico
7. Cálculos para evaluar la estabilidad de la muestra
8. Determinar especificidad

IV. JUSTIFICACION

Disponer de información práctica al Químico que se le encomiende validar métodos analíticos ya que esta actividad forma parte de las normas de calidad con las que se debe cumplir.

Uniformizar los procedimientos para llevar a cabo la validación de una metodología analítica, tratando de hacerlo de una manera sencilla, adecuada, y principalmente, que proporcione información útil y confiable además de contar con ejemplos que nos ayuden a una mejor comprensión y aplicación de lo que aquí se muestra tanto para el profesionalista como para las autoridades responsables del control de calidad de los productos.

V. METODOLOGIA

EXACTITUD

Exactitud: La exactitud de un método analítico es la concordancia entre un valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia. Se expresa como el porcentaje de recobro obtenido del análisis de muestras a las que se les ha adicionado cantidades conocidas de la sustancia.

DETERMINACIÓN

Exactitud al 100%

Se debe cuando menos analizar 6 placebos cargados con el 100% del principio aditivo indicada en la fórmula unitaria y recuperar la sustancia de interés mediante el método de medición, bajo las mismas condiciones de análisis.

CRITERIOS

El intervalo de confianza (IC) para la media, debe incluir el 100%. El coeficiente de variación del método debe cumplir con el propósito para el cual va a ser ampliado.

NOTA: Si en el momento de hacer la linealidad del método se trabajan diferentes concentraciones cuando menos por quintuplicado, la exactitud del método se puede determinar de los valores de linealidad.

TEORÍA DE LA ESTIMACIÓN

La teoría de la estimación consiste en establecer la manera más adecuada de conocer el valor de un parámetro de la población. Se han desarrollado dos maneras de determinar dicho valor, a saber, la estimación puntual y la estimación por intervalo. El primer tipo de estimación indica que el estimador del parámetro de una población a partir de una muestra, debe reunir ciertas características.

ESTIMACIÓN PUNTUAL: Las propiedades de un estimador adecuado son:

- Insesgado. Es aquel estimador cuyo valor de la media de la distribución muestral de estimador, es equivalente al valor del parámetro.

- Eficiente. Es aquel estimador, cuya distribución muestral del estimador tiene asociado una varianza mínima.
- Consistente. Es aquel estimador, que al aumentar el tamaño de la muestra, el valor del estimador tiende al valor del parámetro. Expresado en términos de probabilidad, al aumentar el tamaño de la muestra, la probabilidad de que el estimador tienda al valor del parámetro, tiende al valor de la unidad.
- Suficiente. Es aquel estimador que en su cálculo toma en cuenta toda la información muestral.
- Estimación por Intervalo. Como premisa para desarrollar el concepto de estimación por intervalo, es necesario definir el teorema del límite central.

TEOREMA DEL LIMITE CENTRAL

- 1.- Si las mediciones provenientes de una población tienen una distribución normal; la distribución de las medias de las muestras de mediciones, cualquiera que sea el tamaño de la muestra también tiene una distribución normal.
- 2.- Si las mediciones provenientes de una población "no" tienen una distribución normal; las distribuciones de las medias de las muestras de tamaño "n" tendrán aproximadamente una distribución normal y la aproximación mejora al aumentar el tamaño de la muestra. (Alcántara, 1992).

EXACTITUD Y REPETIBILIDAD AL 100%

1.- Tabular los resultados del porcentaje recuperado.

Porcentaje recuperado

2.- Calcular la suma del porcentaje recuperado (Σy), la suma de cuadrados del porcentaje recuperado (Σy^2) y determinar el número de recobro (n).

$$\Sigma y = \underline{\hspace{2cm}}$$

$$\Sigma y^2 = \underline{\hspace{2cm}}$$

$$n = \underline{\hspace{2cm}}$$

3.- Calcular la media aritmética (\bar{y}) y la desviación estandar (s) del porcentaje recuperado, con la siguiente ecuación:*

$$\bar{y} = \frac{\Sigma y}{n}$$

$$s = \sqrt{\frac{\Sigma y^2 - (\Sigma y)^2 / n}{n - 1}}$$

4. Determinar en la tabla de distribución de "t" de Student el valor de t (n-1, 0.975):

$$t(n-1, 0.975) =$$

INTERVALO DE CONFIANZA PARA PORCIENTO DE RECOBRO

5) Calcular el intervalo de confianza para el porcentaje recuperado [IC(M)] con la siguiente ecuación:

$$IC(M) = y \pm t(n-1, 0.975) \frac{s}{n}$$

PROCEDIMIENTO PARA EVALUAR LA REPETIBILIDAD DEL MÉTODO DE MEDICIÓN

6) Calcular la repetibilidad del método de medición (REP) con la siguiente ecuación:

$$\pm 1.96 * s = \pm$$

LINEARIDAD

DEFINICIÓN: La linealidad de un sistema o método analítico es su habilidad para asegurar que los resultados analíticos, los cuales pueden ser obtenidos directamente o por medio de una transformación matemática bien definida, son proporcionales a la concentración de la sustancia dentro de un intervalo determinado.

LINEARIDAD DEL SISTEMA DE MEDICIÓN

Definición:

Es la relación que se establece mediante un modelo lineal entre una propiedad física, química y/o biológica con la cantidad del fármaco.

Determinación:

Un analista debe de preparar por lo menos 3 diluciones como mínimo por duplicado, de manera independiente, a partir de una solución patrón, midiendo su propiedad bajo las mismas condiciones de medición.

Criterio:

A) La relación entre la concentración y la propiedad medida, debe ser altamente significativo.

B) La ordenada al origen de la relación lineal simple, concentración - propiedad medida, debe estadísticamente igual a cero.

C) El coeficiente de determinación de la relación lineal simple debe ser mayor a 0.98 y/o la falta de ajuste a la relación lineal simple, no debe ser estadísticamente significativa.

Linealidad del sistema:

Se determina, construyendo una curva de calibración de una misma solución patrón utilizando cuando menos 5 diluciones y haciendo análisis por duplicado para cada dilución.

El intervalo entre las concentraciones a analizar dependerá del propósito del método; para propósitos de control de calidad y de seguimiento de la estabilidad de un fármaco en una forma farmacéutica, deberá estar incluido el 100 % de la fórmula unitaria.

Criterio:

$$b = 0, r > 0.99 \quad r^2 > 0.98$$

Linealidad del Sistema

1) Tabular los resultados con base al siguiente formato:

Concentración de la disolución de la solución patrón (x)	Propiedad medida (y)
x_1	$y_{11}, y_{12}, \dots, y_{1n}$
x_2	$y_{21}, y_{22}, \dots, y_{2n}$
-	- - -
-	- - -
-	- - -
x_t	$y_{t1}, y_{t2}, \dots, y_{tn}$

t= número de disoluciones.

n= número de replicaciones (propiedad medida) de cada dilución patrón.

Para proceder a los siguientes cálculos es necesario que el número de replicaciones por dilución, sean equivalentes.

2) Cálculos preliminares para coeficiente de correlación y coeficiente de determinación.

$$\Sigma x = n (x_1 + x_2 + \dots + x_t)$$

$$\Sigma y = y_{11} + y_{12} + \dots + y_{1n} + y_{21} + y_{22} + \dots + y_{2n} + \dots + y_{t1} + y_{t2} + \dots + y_{tn}$$

$$\Sigma x^2 = n (x_1^2 + x_2^2 + \dots + x_t^2)$$

$$\Sigma y^2 = y_{11}^2 + y_{12}^2 + \dots + y_{1n}^2 + y_{21}^2 + y_{22}^2 + \dots + y_{2n}^2 + \dots + y_{t1}^2 + y_{t2}^2 + \dots + y_{tn}^2$$

$$\Sigma xy = x_1(y_{11} + y_{12} + \dots + y_{1n}) + x_2(y_{21} + y_{22} + \dots + y_{2n}) + \dots + x_t(y_{t1} + y_{t2} + \dots + y_{tn})$$

3) Cálculos finales para coeficiente de correlación y coeficiente de determinación:

$$r = \frac{[nt(\Sigma xy) - (\Sigma x)(\Sigma y)]^{1/2}}{[nt(\Sigma x^2) - (\Sigma x)^2]^{1/2} [nt(\Sigma y^2) - (\Sigma Y)^2]^{1/2}}$$

$$r^2 = \frac{[nt(\Sigma xy) - (\Sigma x)(\Sigma y)]^2}{[nt(\Sigma x^2) - (\Sigma x)^2] [nt(\Sigma y^2) - (\Sigma Y)^2]}$$

4. Cálculos para cada punto de la linealidad del sistema el siguiente factor:

$$F = \frac{\text{Propiedad medida (y)}}{\text{conc. de la dilución de la solución patrón (x)}}$$

$$F_{11} = (y_{11} / x_1)$$

$$F_{12} = (y_{12} / x_1)$$

$$F_{1n} = (y_{1n} / x_1)$$

$$F_{t1} = (y_{t1} / x_t)$$

$$F_{t2} = (y_{t2} / x_t)$$

$$F_{tn} = (y_{tn} / x_t)$$

4.2 Calcular la suma de factores, la suma de cuadrados de factores y la media del factor:

$$\Sigma F = F_{11} + F_{12} + F_{1n} + \dots + F_{t1} + F_{t2} + F_{tn}$$

$$\Sigma F^2 = F_{11}^2 + F_{12}^2 + F_{1n}^2 + \dots + F_{t1}^2 + F_{t2}^2 + F_{tn}^2$$

$$\bar{F} = \frac{\Sigma F}{N}$$

donde: N = número de puntos de la linealidad del sistema.

5) Cálculos finales para el coeficiente de variación:

$$DE = \sqrt{\frac{N(\sum F^2) - (\sum F)^2}{N(N-1)}}^{1/2}$$

$$CV = \frac{DE}{\bar{F}} \times 100$$

Linealidad del sistema (ejemplo)

1) Curva de calibración de benzoil metronidazol por absorción al ultravioleta a 309 nm en etanol.

Concentración mg.% a partir
de la solución patrón

Absorbancia

$$x_1 = 0.642$$

$$y_{11} = 0.208 \quad y_{12} = 0.209$$

$$x_2 = 0.963$$

$$y_{21} = 0.315 \quad y_{22} = 0.314$$

$$x_3 = 1.248$$

$$y_{31} = 0.417 \quad y_{32} = 0.418$$

$$x_4 = 1.605$$

$$y_{41} = 0.522 \quad y_{42} = 0.521$$

$$x_5 = 1.926$$

$$y_{51} = 0.629 \quad y_{52} = 0.629$$

El 100% de la dosis corresponde a x_4

$$t = 5$$

$$n = 2$$

2) Cálculos preliminares para el coeficiente de correlación y el coeficiente de determinación.

$$\sum x = 2(0.642 + 0.963 + 1.248 + 1.605 + 1.926) = 12.768$$

$$\sum y = 0.208 + 0.209 + 0.315 + 0.314 + 0.417 + 0.418 + 0.522 + 0.521 + 0.629 + 0.629 = 4.182$$

$$\Sigma x = 2 (0.642 + 0.963 + 1.248 + 1.605 + 1.926) = 18.36508$$

$$\Sigma y = 0.208 + 0.209 + 0.315 + 0.314 + 0.417 + 0.418 + 0.522 + 0.521 + 0.629 + 0.629 = 1.96859$$

$$\Sigma xy = 0.642 (0.208 + 0.209) + 0.963 (0.315 + 0.314) + 1.248 (0.417 + 0.418) + 1.605 (0.522 + 0.521) + 1.926 (0.629 + 0.629) = 6.01244$$

3. Cálculos finales para el coeficiente de correlación y el coeficiente de determinación:

$$r = \frac{[(2)(5)(6.01244) - (12.768)(4.182)]^{1/2}}{[(2)(5)(18.36508) - 12.768^2]^{1/2} [(2)(5)(1.96859) - 4.182^2]^{1/2}}$$

$$r = \frac{6.72862^{1/2}}{(20.62898)(2.19678)} = [0.99905]^{1/2} = 0.99952$$

$$r^2 = \frac{[(2)(5)(6.01244) - (12.768)(4.182)]^2}{[(2)(5)(18.36508) - 12.768^2] [(2)(5)(1.96859) - 4.182^2]}$$

$$r^2 = \frac{6.72862^2}{(20.62898)(2.19678)} = 0.99905$$

4. Cálculos preliminares para el coeficiente de variación:

$$F_{11} = (0.208 / 0.642) = 0.323988$$

$$F_{12} = (0.209 / 0.642) = 0.325545$$

$$F_{21} = (0.315 / 0.963) = 0.327103$$

$$F_{22} = (0.314 / 0.963) = 0.326064$$

$$F_{31} = (0.417 / 1.248) = 0.334135$$

$$F_{32} = (0.418 / 1.248) = 0.334936$$

$$F_{41} = (0.522 / 1.605) = 0.325234$$

$$F_{42} = (0.521 / 1.605) = 0.324611$$

$$F_{51} = (0.629 / 1.926) = 0.326584$$

$$F_{52} = (0.629 / 1.926) = 0.326584$$

$$\Sigma F = 0.323988 + 0.325545 + 0.327103 + 0.326064 + 0.334135 + 0.334936 + \\ 0.325234 + 0.324611 + 0.326584 + 0.326584 = 3.274784$$

$$\Sigma F^2 = 0.323988^2 + 0.325545^2 + 0.327103^2 + 0.326064^2 + 0.334135^2 + 0.334936^2 \\ + 0.325234^2 + 0.324611^2 + 0.326584^2 + 0.326584^2 = 1.072554$$

$$F = \frac{3.274784}{10} = 0.3274784$$

5. Cálculos finales para el coeficiente de variación:

$$DE = \frac{|10 (1.072554) - (3.274784)^2|^{1/2}}{|10 (10 - 1)|}$$

$$DE = \frac{|10.72554 - 10.724210|^{1/2}}{|10 (9)|} = (0.00133 / 90)^{1/2}$$

$$DE = (0.000014778)^{1/2} = 0.0038442$$

$$CV = (0.0038442 / 0.3274784) \times 100 = 1.17\%$$

Ya que $r > 0.99$, $r > 0.98$ y $CV \leq 1.5\%$, se cumple con los criterios para linealidad del sistema.

Linealidad del método de medición

Es la relación que se establece mediante una recta, entre una propiedad medible (cantidad de fármaco recuperado) y el valor real de la propiedad (cantidad de fármaco adicionado).

Se determina a partir de placebos adicionados de cuando menos tres diferentes cantidades de la sustancia de interés, (placebos cargados), cada uno de manera independiente, haciendo los análisis por triplicado.

Las concentraciones de los placebos cargados deben ser las adecuadas para que, utilizando el método propuesto, las concentraciones de las soluciones finales a analizar estén dentro del intervalo de la linealidad del sistema, incluyendo siempre la correspondiente al 100%.

La amplitud del estudio dependerá del uso y aplicaciones del método, (Control de Calidad, Estudio de Estabilidad, etc.) y deberá llevarse a cabo por un mismo analista en las mismas condiciones de operación.

Criterio

Cantidad adicionada vs cantidad recuperada: $m= 1$, $b= 0$,

$$r^2 = 0.98$$

Los porcentos recuperados y los CV a cada nivel y los globales de todo el intervalo de la linealidad deben de estar de acuerdo en la tabla 1.

Tabla 1

MÉTODO:	Promedio de recobro	CV
Cromatográficos	98 - 102%	2%
Titrimétricos	98 - 102%	2%
Químicos y espectrofotométricos	97 - 103%	3%
Microbiológicos	95 - 105%	5%

Nota: En los métodos para cuantificar fármacos en fluidos biológicos la amplitud del estudio.

Linealidad del método de medición

Determinación:

Un analista debe preparar placebos adicionados de manera independiente, por lo menos por duplicado, como mínimo a tres distintas cantidades adicionadas y recuperar el activo, empleando el método de medición, bajo las mismas condiciones de análisis.

Criterios:

- A) La relación lineal simple, cantidad adicionada-cantidad recuperada, debe ser altamente significativa.
- B) El coeficiente de determinación de la relación lineal simple de cantidad adicionada-cantidad recuperada debe ser mayor de 0.98 y/o a la falta de ajuste a la relación lineal simple cantidad adicionada-cantidad recuperada, no debe ser estadísticamente significativa.
- C) La ordenada al origen de la relación lineal simple cantidad adicionada-cantidad recuperada, debe ser estadísticamente igual a cero.
- D) La pendiente de la relación lineal simple cantidad adicionada-cantidad recuperada, debe ser estadísticamente igual a uno.
- E) La desviación estandar de regresión y la desviación estandar del error puro deben de cumplir con los requisitos establecidos para el principio de medición y/o para el propósito para el cual va a ser empleado el método de medición.

Cálculos para determinar la linealidad del método de medición

A. Cantidad Adicionada - Cantidad Recuperada

1) Tabular los resultados con base al siguiente formato:

Cantidad Adicionada (x)	Cantidad Recuperada (y)
$x_{11}, x_{12}, \dots, x_{1n}$	$y_{11}, y_{12}, \dots, y_{1n}$
$x_{21}, x_{22}, \dots, x_{2n}$	$y_{21}, y_{22}, \dots, y_{2n}$
.	.
$x_{t1}, x_{t2}, \dots, x_{tn}$	$y_{t1}, y_{t2}, \dots, y_{tn}$

t = número de cantidades adicionadas

n = número de replicaciones (cantidad recuperada) por cada cantidad adicionada

Para proceder a los siguientes cálculos, es necesario que el número de cantidades recuperadas (replicaciones) de cada cantidad adicionada, sean equivalentes.

2) Cálculos Preliminares:

$$\Sigma X = x_{11} + x_{12} + \dots + x_{1n} + x_{21} + x_{22} + \dots + x_{2n} + \dots + x_{t1} + x_{t2} + \dots + x_{tn}$$

$$\Sigma y = y_{11} + y_{12} + \dots + y_{1n} + y_{21} + y_{22} + \dots + y_{2n} + \dots + y_{t1} + y_{t2} + \dots + y_{tn}$$

$$\Sigma X^2 = x_{11}^2 + x_{12}^2 + \dots + x_{1n}^2 + x_{21}^2 + x_{22}^2 + \dots + x_{2n}^2 + \dots + x_{t1}^2 + x_{t2}^2 + \dots + x_{tn}^2$$

$$\Sigma y^2 = y_{11}^2 + y_{12}^2 + \dots + y_{1n}^2 + y_{21}^2 + y_{22}^2 + \dots + y_{2n}^2 + \dots + y_{t1}^2 + y_{t2}^2 + \dots + y_{tn}^2$$

$$\Sigma xy = x_{11}y_{11} + x_{12}y_{12} + \dots + x_{1n}y_{1n} + x_{21}y_{21} + x_{22}y_{22} + \dots + x_{2n}y_{2n} + \dots + x_{t1}y_{t1} + x_{t2}y_{t2} + \dots + x_{tn}y_{tn}$$

3) Cálculos finales:

$$m = \frac{nt (\Sigma xy) - (\Sigma x) (\Sigma y)}{nt (\Sigma x^2) - (\Sigma x)^2}$$

$$b = \frac{y - m (\Sigma x)}{nt}$$

$$r^2 = \frac{[nt (\Sigma xy) - (\Sigma x) (\Sigma y)]^2}{[nt (\Sigma x^2) - (\Sigma x)^2] [nt (\Sigma y^2) - (\Sigma y)^2]}$$

B. Porcentaje Recuperado.

Calcular el porcentaje recuperado (R) para cada cantidad recuperada, con la siguiente ecuación :

$$R = (y / x) 100$$

1) Tabular los resultados:

$$R_1, R_2, R_3, \dots, R_n$$

2) Cálculos preliminares:

$$\Sigma R = R_1, R_2, R_3, \dots, R_n$$

$$\Sigma R^2 = R_1^2, R_2^2, R_3^2, \dots, R_n^2$$

$$\bar{R} = (\Sigma R) / N \quad DE = \sqrt{\frac{N (\Sigma R^2) - (\Sigma R)^2}{N (N-1)}}$$

3) Cálculos finales:

Coeficiente de variación:

$$CV = (DE / \bar{R}) 100$$

Linealidad del método (ejemplo)

A. Cantidad Adicionada - Cantidad Recuperada

Cantidad adicionada (x)	Cantidad recuperada (y)		
$x_1 = 60$	$y_{11} = 59.84$	$y_{12} = 59.66$	$y_{13} = 60.03$
$x_2 = 100$	$y_{21} = 100.16$	$y_{22} = 99.48$	$y_{23} = 100.26$
$x_3 = 120$	$y_{31} = 119.67$	$y_{32} = 119.81$	$y_{33} = 119.69$

$$t = 3; n = 3$$

(Nota: En este ejemplo: $x_{11}, x_{12}, x_{13} = 60$;
 $x_{21}, x_{22}, x_{23} = 100$; $x_{31}, x_{32}, x_{33} = 120$)

2) Cálculos preliminares.

$$\Sigma x = 3(60 + 100 + 120) = 840$$

$$\Sigma y = 59.84 + 59.66 + 60.03 + 100.16 + 99.48 + 100.26 + 119.67 + 119.81 + 119.69 = 838.6$$

$$\Sigma x^2 = 3(60^2 + 100^2 + 120^2) = 84000$$

$$\Sigma y^2 = 59.84^2 + 59.66^2 + 60.03^2 + 100.16^2 + 99.48^2 + 100.26^2 + 119.67^2 + 119.81^2 + 119.69^2 = 83725.1468$$

$$\Sigma xy = 60(59.84 + 59.66 + 60.03) + 100(100.16 + 99.48 + 100.26) + 120(119.67 + 119.81 + 119.69) = 83862.2$$

3) Cálculos finales.

$$m = \frac{(3)(3)(83862.2) - (840)(838.6)}{(3)(3)(84000) - 840^2} = \frac{50335.8}{50400.0} = 0.99873$$

$$b = \frac{838.6 - 0.99873(840)}{(3)(3)} = -0.03702$$

$$r = \frac{[(3)(3)(83862.2) - (840)(838.6)]^2}{[(3)(3)(84000) - 840^2][(3)(3)(83725.1468) - 838.6^2]}$$

$$r^2 = \frac{50335.8^2}{(50400)(50276.3612)} = 0.99991$$

Ya que $b = 0$, $m = 1$, $r^2 > 0.98$; se cumplen los criterios para la linealidad del método.

B. Por ciento recuperado.

Cálculo del por ciento recuperado, para cada cantidad recuperada.

$$R_1 = (59.84 / 60) \times 100 = 99.73$$

$$R_2 = (59.66 / 60) \times 100 = 99.43$$

$$R_3 = (60.03 / 60) \times 100 = 100.05$$

$$R_4 = (100.16 / 100) \times 100 = 100.16$$

$$R_5 = (9.48 / 100) \times 100 = 99.48$$

$$R_6 = (100.26 / 100) \times 100 = 100.26$$

$$R_7 = (119.67 / 120) \times 100 = 99.72$$

$$R_8 = (119.81 / 120) \times 100 = 99.84$$

$$R_9 = (119.69 / 120) \times 100 = 99.74$$

1) Tabular los resultados.

99.73, 99.43, 100.05, 100.16, 99.48, 100.26, 99.72, 99.84, 99.74

N = 9

2) Cálculos preliminares.

$$\Sigma R = 99.73 + 99.43 + 100.05 + 100.16 + 99.48 + 100.26 + 99.72 + 99.84 + 99.74 = 898.41$$

$$\Sigma R^2 = 99.73^2 + 99.43^2 + 100.05^2 + 100.16^2 + 99.48^2 + 100.26^2 + 99.72^2 + 99.84^2 + 99.74^2 = 89682.9355$$

$$\bar{R} = \frac{898.41}{9} = 99.8233$$

$$DE = \sqrt{\frac{9(89682.9355) - (898.41)^2}{9(9-1)}} = 0.2861$$

3) Cálculos Finales.

Coefficiente de variación

$$CV = \frac{0.2861}{99.8233} \times 100 = 0.29\%$$

Ya que el coeficiente de variación es menor al 3% se cumple con los criterios.

PRECISIÓN

PRECISIÓN: La precisión de un método analítico es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales, cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes muestreos de una muestra homogénea del producto. Usualmente se expresa en términos de Desviación Estándar o del Coeficiente de Variación. La precisión es la medida del grado de reproductividad y/o repetibilidad del método analítico, bajo condiciones normales de operación.

a) **REPETIBILIDAD:** Es la precisión de un método analítico expresado como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas por un solo analista, usando los mismos aparatos y técnicas.

b) **REPRODUCIBILIDAD:** Es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia entre determinaciones independientes, realizadas por diferentes analistas, en diferentes días, en el mismo y/o diferentes equipos.

DETERMINACIÓN: Se deben llevar a cabo por lo menos por dos analistas en dos días diferentes y por triplicado cada muestra.

Trabajar de manera independiente partiendo de una muestra homogénea del producto, cercana al 100% de la concentración teórica.

CRITERIO: El coeficiente de variación total debe cumplir con los fines para los cuales el método será utilizado.

MÉTODO	CV
Cromatográficos	< 2 %
Químicos y Espectrofotométricos	< 3 %
Microbiológicos	< 5 %

DETERMINACIÓN: Por lo menos dos analistas, en por lo menos dos determinaciones independientes deben analizar independientemente una muestra homogénea del producto como mínimo por triplicado, cercana al 100% de lo indicado en la fórmula unitaria.

CRITERIOS:

A) El coeficiente de variación total, debe de satisfacer los requisitos establecidos para el principio de medición y/o para la utilización del método de medición.

B) La repetibilidad del método de medición, debe de satisfacer los requisitos establecidos para el principio de medición y/o para la utilización del método de medición.

C) La reproducibilidad interanalista y la reproducibilidad interdia/analista, debe de satisfacer los requisitos establecidos para el principio de medición y/o para la utilización del método de medición.

VARIABLE DE RESPUESTA: Característica de una unidad experimental sujeta a un proceso de medicina, la cual se emplea como variable indicadora de un posible efecto de otra u otras variables en el estudio.

ESTUDIO EXPERIMENTAL O EXPERIMENTO: Estudio prospectivo, comparativo (causa a efecto), longitudinal y experimental, entre las variables de un proceso sistema o fenómeno.

DISEÑO EXPERIMENTAL: Significa planear el experimento, de tal forma que se reúna la información pertinente al estudio bajo investigación, seguir una serie de actividades planeadas de antemano, para asegurar que el análisis objetivo de los resultados experimentales, conduzca a inducciones válidas.

FACTOR O FACTOR DE VARIACIÓN: Variable que es controlada en el experimento, con el objeto de evaluar su efecto sobre la variable de respuesta.

NIVELES DEL FACTOR: Son las distintivas clasificaciones o modalidades que se le asignan a un factor, dentro de un experimento.

CLASIFICACIONES DE FACTORES

Los factores se dividen dependiendo de las clasificaciones o modalidades de los niveles de los factores en:

Factores Cualitativos: Cuando los niveles del factor son categóricos.

Factores Cuantitativos: Cuando los niveles del factor son numéricos.

Los factores se dividen dependiendo de la naturaleza de la inferencia en:

Factores Fijos: Cuando la inferencia únicamente se aplica a los niveles del factor que se evalúan en el experimento.

Generalmente los factores cuantitativos se consideran fijos.

Factores Aleatorios: Cuando la inferencia únicamente se aplica, además de los niveles del factor involucrados en el experimento, a otros niveles del factor no involucrados en el experimento. Generalmente los factores cualitativos se consideran aleatorios, siempre y cuando la selección de los niveles sea por un procedimiento de muestreo o estos sean representativos del factor. Los factores cualitativos también pueden clasificarse como fijos, si únicamente la inferencia se aplica a los niveles del factor involucrados en el experimento.

Tratamiento: Es el conjunto particular de condiciones experimentales, provenientes de la combinación de los niveles de dos o más factores o de los niveles de un factor.

Diseño de Tratamientos: Es la estructura o arreglo que tienen los tratamientos, en función de los niveles del factor o de factores involucrados en el experimento.

Matriz de tratamientos: Es la representación en forma de renglones y/o columnas de los tratamientos, en términos de los niveles de uno o más factores.

Unidad Experimental: Es la entidad de experimentación independiente, a la cual se le asigna un tratamiento.

Error Experimental: Medida de la concordancia relativa de la variable de respuesta, de dos o más unidades experimentales sujetas a un mismo tratamiento.