

CAPITULO 2

EL MÉTODO ANALÍTICO EN EL CONTROL DE CALIDAD

María Guillermina Volonté

El concepto de Validación

En el capítulo anterior mencionamos que la validación es la parte de las GMP por la cual se logra que los sistemas, los equipos, los procesos y los procedimientos para los ensayos de calidad estén bajo control y, por consiguiente, se produzca uniformemente un producto de calidad.

La validación se define como el establecimiento de pruebas de laboratorio, debidamente documentadas, que aportan un alto grado de seguridad de que un proceso planificado se efectuará uniformemente en conformidad con los resultados previstos especificados, es decir, que dicho proceso será apropiado para el uso propuesto. Los estudios de validación son aplicables a los métodos analíticos no codificados en las Farmacopeas, a los equipos tanto de producción como analíticos, a las computadoras, programas y sistemas, así como a los servicios del establecimiento (por ejemplo aire, agua, vapor, etc.) y a los procesos (como el de fabricación, limpieza, esterilización, llenado estéril, liofilización, etc.). Se hará una validación para el liofilizador como equipo y otra para el proceso de liofilización; una para la limpieza del material de vidrio y otra para la limpieza del establecimiento; una para el proceso de esterilización y otra para las pruebas de esterilidad. Es preciso demostrar que cada paso del proceso de fabricación de un medicamento se efectúa según lo previsto.

Los objetivos de una validación son otorgar Confiabilidad, Seguridad y Efectividad al proceso que se está validando.

Y por qué se debe validar? Porque un sistema validado es un sistema estable, capaz y robusto y es así como nos interesa mantenerlo, dado que estas características son esenciales para mantener altos niveles de calidad

Los estudios de validación verifican el sistema en estudio y en condiciones de pruebas extremas (pruebas a las que se llaman habitualmente “peor caso”),

semejantes a las que cabría esperar durante el proceso, a fin de comprobar que dicho sistema está bajo control. Una vez que el sistema o proceso se ha validado, cabe prever que permanezca bajo control, siempre y cuando no se hagan cambios en el mismo. Si se producen modificaciones o surgen problemas, o si un equipo se sustituye o se cambia de ubicación, habrá que efectuar la revalidación. Los equipos y procesos de importancia crítica se revalidan en forma sistemática a intervalos adecuados a fin de demostrar que siguen bajo control.

El concepto de validación se aplicó por primera vez en la producción estéril. A raíz de varios graves incidentes ocurridos en Estados Unidos en 1968, en Inglaterra en 1972 y en Francia en 1977, donde murieron pacientes a los que se les habían administrado soluciones intravenosas contaminadas, se vio la necesidad de intensificar los controles a los procesos de esterilización y envasado aséptico. En el caso de Inglaterra la investigación mostró tres fallos no detectados: el autoclave no alcanzó en todo su volumen la temperatura de esterilización, por estar una válvula bloqueada; el operario hizo caso omiso del registro de temperatura (incorrecto) por ser correcto el de presiones y el test de esterilidad no detectó el fallo a pesar de estar contaminadas 1/3 de las unidades, ya que solo se muestreó de la parte superior de la carga.

Las validaciones pueden ser Retrospectivas cuando combinan nuevos criterios con la experiencia adquirida anteriormente o Prospectivas cuando se inicia desde un comienzo una validación. La Revalidación se realiza cuando procedimientos ó métodos ya validados han sufrido alguna modificación o cambios en la droga o en la composición del producto y por lo tanto se deben volver a validar. También se debe realizar cuando la matriz y/o la concentración de analito son distintos a los originalmente analizados.

Con la validación se consigue un aseguramiento de la calidad correcto, reducción de costos, aumento de la productividad, cumplimiento de las regulaciones y optimización de los procesos.

Las validaciones se deben llevar a cabo en plantas pilotos donde se elaboran nuevos productos, en plantas farmacéuticas, en plantas químicas que elaboran

drogas o excipientes, en plantas que elaboran productos de diagnóstico, en plantas de biotecnología y en laboratorios de control.

Cuándo se valida se debe realizar una planificación previa con todas las variables, eligiendo siempre el “peor caso”. Se debe elaborar un Plan Maestro, protocolos de validación, un plan de muestreo extensivo, considerar el proceso propiamente dicho, un análisis físico químico y microbiológico intensivo y por último un informe final.

Para la planificación debe existir un comité de validación formado por expertos de las distintas disciplinas, quienes deberán elaborar un listado de prioridades. El Plan Maestro es un programa que describe cómo se planifica y de que manera se hará el trabajo de validación antes de que el área, planta, operación o proceso pueda ser considerado para ser validado. El nivel de detalles varía con la magnitud del plan. El protocolo es un documento de investigación e imaginación. Describe paso a paso como será la validación antes de comenzar. El plan de muestreo forma parte del protocolo. No es el plan de muestreo rutinario a utilizar durante una producción normal del producto. Respecto del número de muestras a evaluar, dependerá si estamos validando un proceso o un producto, habitualmente se utilizan tres lotes. Estadísticamente es un número pobre, pero aceptable. No se puede fabricar una cantidad mayor y elegir los tres mejores lotes o los tres que cumplieron. Se debe determinar previamente tres lotes consecutivos con sus números de lote a ser fabricados en el futuro para ser parte de la validación.

La producción deberá seguir los métodos de manufactura y la formula aprobados, pero con especial cuidados y detalles. Los análisis físico químicos y microbiológicos son la parte más delicada, la que más puede ser influida por errores humanos, de equipos no validados, etc. En el informe final se incluirán los resultados analíticos de las muestras durante el proceso y del producto terminado o del método validado y un dictamen final.

Antes de iniciar una validación se debe verificar que las instalaciones donde se realizará la misma sean adecuadas, al igual que los Procedimientos Operativos que se van a utilizar, que los equipos estén calificados, que los materiales y reactivos sean los adecuados, que las sustancias de referencia con las cuales

se hará la validación sean trazables y que el personal a cargo de la validación esté capacitado y entrenado.

El Método Analítico

El empleo de métodos analíticos se inicia en la etapa de investigación y desarrollo de un medicamento, para luego aplicarse en las diferentes fases de su fabricación, así como en estudios posteriores tales como los de bioequivalencia, analizando el fármaco en fluidos biológicos, para establecer condiciones de intercambiabilidad. En cada uno de los casos la metodología analítica deberá ajustarse a los requerimientos necesarios para cumplir con la finalidad específica de la mencionada etapa.

Con la aplicación de métodos analíticos podremos dar respuesta a diversos interrogantes que debemos afrontar cuando a calidad de un medicamento nos referimos. Entre otros, los principales son:

La identidad y la pureza del principio activo y de los excipientes empleados en la formulación, ¿cumplen con las especificaciones farmacopeicas?

Cuál es el contenido de principio activo en la formulación? Cumple con lo que declara?

Cuál es su estabilidad y cuál su fecha de vencimiento?

A qué velocidad se libera el activo desde la forma farmacéutica, para luego absorberse?

Cuál es la concentración del fármaco en un fluido biológico, después de administrar una dosis de medicamento?

La elección del método analítico adecuado para responder a cada una de estas preguntas, será determinante para la veracidad de los resultados obtenidos, ya que no siempre el mismo método analítico será válido para obtener la respuesta correcta, quizás el método seleccionado para evaluar la pureza de la materia prima del principio activo, no sea el óptimo para controlar el contenido del mismo en la formulación o para establecer su estabilidad en dicha formulación. En las Farmacopeas podremos encontrar las especificaciones de

los métodos a utilizar en cada uno de estos casos, así como la instrumentación más idónea, las cuales habitualmente requieren de la utilización de sustancias de referencia apropiadas, de calidad garantizada, tanto para calibrar los equipos utilizados, como para llegar a un resultado cuantitativo con el método de análisis propuesto.

En todos los casos los métodos analíticos que se utilicen deberán estar siempre validados, como cualquier otro proceso utilizado en la fabricación industrial de medicamentos, tal como ya hemos señalado.

Validación del método analítico

Por validación analítica se entiende el trabajo experimental encaminado a obtener pruebas documentadas de que un método proporciona fehacientemente la información requerida al uso al que se destina. En otras palabras la validación nos otorga la confianza necesaria para aplicar el método y a su vez confiar en los resultados obtenidos: un método analítico validado es un método analítico confiable.

Las Buenas Prácticas de Fabricación y Control (GMP) requieren que los métodos analíticos empleados para evaluar las especificaciones establecidas sean apropiados.

La validación de un método es el proceso por el cual se establece, por medio de estudios de laboratorio, que un método es adecuado para el uso propuesto.

Aspectos regulatorios de la validación

- A nivel Nacional:
 - Farmacopea Argentina (FA) VII ed. <1130> Validación de Métodos analíticos.
 - Disposiciones de la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT) 1930/92, 853/99, 2819/04.

- A nivel Internacional:
 - USP 34 <1225> Validation of Compendials methods.
 - International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH) (Japón, Estados Unidos y la Comunidad Europea), Guidelines Q2A y Q2B.

Qué debe validarse?

Deben validarse métodos analíticos de:

- Materias Primas.
- Control de Procesos.
- Control de Productos Intermedios.
- Control de Productos Terminados.
- Estudios de Estabilidad.
- Validaciones de Limpieza.

Todos los métodos no codificados en Farmacopeas reconocidas deben ser validados; los métodos codificados en Farmacopeas sólo deben validarse cuando son destinados a estudios de Estabilidad y para Validación de Limpieza.

Parámetros a evaluar

- Especificidad.
- Linealidad y Rango.
- Exactitud.
- Precisión
 - Repetibilidad
 - Precisión Intermedia

- Reproducibilidad
- Sensibilidad
 - Límite de Detección (LD)
 - Límite de Cuantificación (LC)
- Robustez.

Cada uno de estos Parámetros se determina utilizando un estándar del analito ó Sustancia de Referencia.

En qué casos evaluar cada parámetro?

Los métodos analíticos se clasifican en 4 categorías:

- **CATEGORÍA I:** Incluye los métodos analíticos para la cuantificación de los componentes mayoritarios de las materias primas o de los principios activos (incluyendo los conservantes) en productos farmacéuticos.
- **CATEGORÍA II:** Incluye los métodos analíticos empleados para la determinación de impurezas en las materias primas o productos de degradación en los productos farmacéuticos. Estos métodos incluyen valoraciones cuantitativas y ensayos límites.
- **CATEGORÍA III:** Incluye métodos analíticos para la determinación de las características de desempeño (como por ejemplo, disolución, liberación de principios activos).
- **CATEGORÍA IV:** Incluye ensayos de identificación.

Para cada categoría de análisis, se necesita diferente información analítica. En la tabla a continuación, se indican los elementos que normalmente se requieren para cada una de estas categorías.

	CATEGORÍA DEL MÉTODO				
	I	II (Cuant.)	II (Lím.)	III	IV
Especificidad	+	+	+	(*)	+
Linealidad	+	+	(*)	(*)	(*)
Exactitud	+	+	(*)	(*)	(*)
Precisión	+	+	(*)	+	(*)
LD	(*)	(*)	+	(*)	+
LC	(*)	+	(*)	(*)	(*)
Robustez	+	+	+	+	+
Intervalo	+	+	(*)	(*)	(*)

(*) Puede requerirse según la naturaleza del ensayo.

A continuación se definen cada uno de los atributos necesarios para validar un método analítico junto con una breve descripción de cómo deben determinarse. Cada uno de los parámetros se determinan utilizando Sustancia de Referencia o estándar del analito (SR)

Especificidad

Definición

La especificidad de un método implica su capacidad para evaluar al analito en presencia de otros componentes que pueden estar presentes, tales como impurezas, productos de degradación, componentes de la matriz, productos laterales de síntesis, componentes endógenos o metabolitos del mismo analito en un fluido biológico, excipientes, etc. En otras palabras, se deberá corroborar que la matriz que rodea al analito, no influya en los resultados obtenidos al aplicar el método.

Determinación

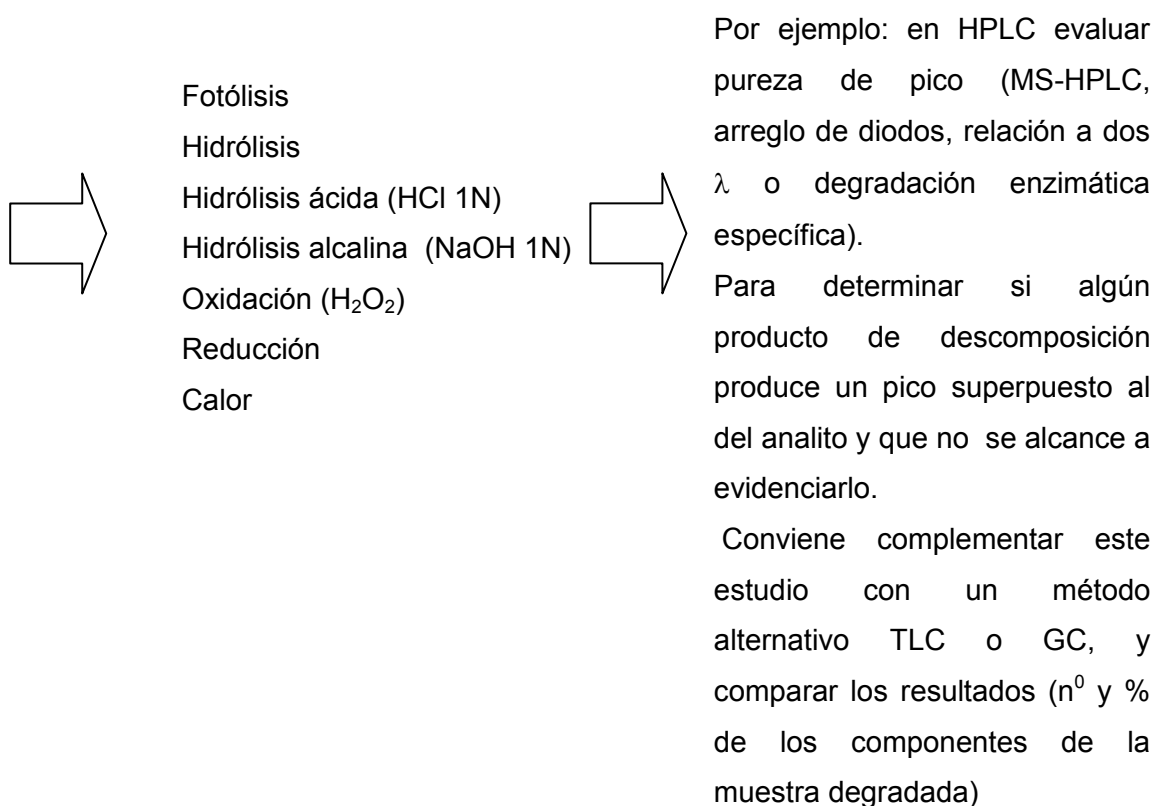
a) *Si se dispone de dichos componentes.*

- **En el caso de análisis cualitativo** (ensayos de identificación) debe demostrarse la capacidad de discriminar entre sustancias de estructuras

estrechamente relacionadas que pudieran estar presentes. La discriminación del método se determina aplicando el mismo a una muestra conteniendo SR y los otros componentes y a una muestra que no contenga SR (blanco).

- **En el caso del análisis de impurezas**, la especificidad puede establecerse por el agregado de cantidades apropiadas de impurezas a la SR o al producto farmacéutico y demostrando que estas impurezas son determinadas con la precisión y exactitud necesarias.
 - **En el caso de una valoración**, se debe demostrar que el método no se ve afectado por la presencia de impurezas o excipientes. En la práctica, esto puede realizarse agregando, a la SR, cantidades apropiadas de impurezas o excipientes y/o al producto farmacéutico, cantidades apropiadas de impurezas, demostrando que el resultado de la valoración no se ve afectado por la presencia de estos materiales extraños.
- b) *Si no se dispone de dichos componentes (productos de degradación o impurezas).*
- La especificidad puede ser demostrada por comparación de los resultados del ensayo con muestras que contienen impurezas o productos de degradación a través de un segundo método independiente (como por ejemplo, métodos farmacopeicos u otro método analítico validado). Estas comparaciones deberían incluir muestras almacenadas bajo condiciones exigentes de calor, humedad, hidrólisis ácido-base y oxidación. En el caso de valoraciones los dos resultados deberían compararse. En el caso de ensayos cromatográficos para impurezas deberían compararse los perfiles cromatográficos.

- Otra forma sería generar productos de descomposición mediante degradaciones forzadas parciales (no mayor a un 20%):



Criterios de aceptación

No deben observarse interferencias entre las señales de los excipientes, impurezas de síntesis y/o productos de degradación y la señal o respuesta (por ejemplo: absorbancia, área o altura de pico, etc.) del compuesto de interés.

Linealidad e Intervalo

Definición

La linealidad de un método analítico es su capacidad de producir resultados directamente proporcionales a la concentración de analito, dentro de un intervalo de concentración. En algunos casos puede ser necesaria la aplicación de transformaciones matemáticas para obtener una recta.

El intervalo se refiere al rango de concentraciones de analito que pueden ser determinadas con precisión y exactitud. Normalmente se expresa con las mismas unidades que los resultados del ensayo.

Determinación

La linealidad debe establecerse a lo largo del intervalo de concentraciones del método analítico. Se debe establecer por medio de un método estadístico adecuado (por ejemplo regresión por cuadrados mínimos). Deben informarse el coeficiente de correlación (r), el coeficiente de determinación (r^2) la ordenada al origen (a) y la pendiente (b) de la recta de regresión.

Para establecer la linealidad se debe ensayar un mínimo de cinco concentraciones con tres réplicas de cada uno y tres determinaciones de cada réplica.

Se recomienda considerar los siguientes intervalos:

- Para la Valoración de una sustancia (o producto farmacéutico): 80-120% de la concentración de ensayo.
- Para la determinación de Impurezas: LC (límite de cuantificación)-120% de la especificación.
- Para la determinación de Uniformidad de contenido: 70-130% de la concentración del ensayo a menos que se justifique otro intervalo de acuerdo a la naturaleza de la forma farmacéutica.
- Para ensayos de Disolución: $\pm 20\%$ del intervalo especificado.
- Para estudios de estabilidad: 40-120% de la concentración de ensayo.

Con los resultados obtenidos se evalúa la linealidad por el método de regresión de los cuadrados mínimos, de tal manera de obtener la ecuación de una recta:
 $y = a + bx$

$$a = \frac{\sum y_i - b \sum x_i}{n}$$

La ordenada (**a**) evalúa la proporcionalidad entre la señal y la concentración (si hay errores aleatorios, la recta no pasa por cero)

$$b = \frac{\sum x_i y_i - \frac{\sum x_i \sum y_i}{n}}{\sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{n}}$$

La pendiente (**b**) evalúa la sensibilidad del método.

$$r = \frac{\sum x_i y_i - \frac{\sum x_i \sum y_i}{n}}{\sqrt{(\sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{n})(\sum y_i^2 - \frac{(\sum y_i)^2}{n})}}$$

El coeficiente de regresión lineal (r) mide el ajuste al modelo lineal.

El valor $r=1$ indica una recta perfectamente lineal; un valor $r=0$ indica la no correlación entre x e y . Sin embargo, el mejor indicador del modelo lineal no es r sino un test estadístico de Student (t), en el cual se calcula un valor de t_r para $(n-2)$ grados de libertad y se compara con el valor t tabulado para el nivel de confianza requerido.

En este caso, la Hipótesis Nula (H_0) es la no correlación entre x e y . Si el valor observado de t_r es mayor que t de tabla, se rechaza la hipótesis nula, siendo la correlación lineal significativa con la probabilidad calculada.

$$t_r = \frac{|r| \sqrt{(n-2)}}{\sqrt{(1-r^2)}}$$

Donde r^2 = coeficiente de determinación
 n = número de determinaciones independientes

Los límites de confianza del estimador de la pendiente (b) y la ordenada al origen (a) se calculan en función de sus varianzas.

$$S_a = \sqrt{S_b^2 \frac{\sum x_i^2}{n}}$$

$$S_b = \sqrt{\frac{S_{xy}^2}{\sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{n}}}$$

$$S_{xy}^2 = \frac{\sum y_i^2 - a \sum y_i - b \sum x_i y_i}{n-2}$$

Luego los intervalos de confianza serán:

$\swarrow$
 $\searrow$

$[b \pm t S_b]$
 $[a \pm t S_a]$

Siendo t el que figura en tabla de Student para cierto nivel de confianza, generalmente 0,05 y (n-2) grados de libertad.

Criterios de aceptación

- Coeficiente de correlación:
 - para Macrocomponentes, $r \geq 0,99$ y $r^2 \geq 0,98$
 - para Impurezas, $r \geq 0,98$.
- Intervalo de confianza de la ordenada al origen: debe incluir al cero.

Exactitud

Definición

La exactitud, interpreta los errores sistemáticos o tendencia de un método analítico, expresa la proximidad entre el resultado obtenido y “el valor verdadero”. Debe establecerse en todo el rango especificado para el método analítico.

Matemáticamente suele expresarse de los siguientes modos:

- Error absoluto = $\bar{X} - \hat{X}$
 - Error relativo % = $\frac{(\bar{X} - \hat{X}) \times 100}{\hat{X}}$
 - Recuperación = $\frac{\bar{X} \times 100}{\hat{X}}$
- $\bar{X}$: valor medio experimental
 $\hat{X}$: valor verdadero

Los errores deben ser tan pequeños como sea posible para que el valor medio experimental se aproxime al de referencia o verdadero, si no fuera así y según su significancia los aceptaremos o reformularemos el protocolo de aplicación del método, para minimizarlos o adaptarlos a los requerimientos exigidos para cada método analítico, en lo que a errores se refiere.

Dicho de otro modo, la recuperación debe acercarse al 100%, En todos los casos, la exactitud debe evaluarse mediante el diseño que emplea un mínimo de nueve determinaciones sobre un mínimo de tres niveles de concentración que cubran el intervalo especificado para linealidad, por ejemplo tres concentraciones al 80, 100 y 120% del valor esperado, al que se le agregan los excipientes del producto (Ensayo de Recuperación), con tres repeticiones completas del método para cada una de las concentraciones. Puede utilizarse un test t de Student, efectuando varias determinaciones de la muestra de concentración conocida y calculando el t experimental, t_{ob} , que se compara con el t de tabla para $(n-1)$ grados de libertad en el nivel de confianza escogido, generalmente $p = 0,05$.

[H_0 : no hay error sistemático]

$$t_{ob} = \frac{|\hat{X} - \bar{X}|}{\frac{S}{\sqrt{n}}}$$

$$t_{ob} = \frac{|100 - R|}{\frac{CV}{\sqrt{n}}}$$

Si $t_{ob} < t$ de tabla, no existen diferencias significativas entre recuperación media y 100 % y por lo tanto el método tiene la exactitud requerida para ese ámbito de confianza.

Si $t_{ob} > t$ de tabla, el método tiene un error sistemático para ese ámbito de confianza.

S: desviación estándar,

n: número de determinaciones independientes.

R: recuperación porcentual promedio de todas las concentraciones.

CV: coeficiente de variación.

Por otra parte, resulta conveniente graficar en todos los casos descriptos a continuación, masa hallada vs. masa agregada, rectificando por el método de los cuadrados mínimos. En este caso $r \geq 0.99$, la pendiente deberá ser cercana a 1 o el Intervalo de confianza de la pendiente incluir al 1 y la ordenada al origen deberá ser próxima a 0 o el intervalo de confianza de la ordenada incluir al 0. Si la pendiente fuera significativamente distinta de 1 indica un error proporcional (por ejemplo, debida a la extracción de un porcentaje constante del componente). Una ordenada al origen significativamente diferente a cero indica un error de tendencia constante y se visualiza como una recta paralela a

la teórica, en la cual el valor de la ordenada al origen corresponde a la magnitud del error.

Si no es posible obtener muestras de todos los componentes del producto, puede ser aceptable agregar cantidades conocidas del analito al producto (Método del Estándar Agregado) o comparar los resultados obtenidos con un segundo método cuya exactitud haya sido establecida.

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{(C_m + s - C_m) \times 100}{C_s}$$

C_m: concentración de la muestra o producto sin agregado de SR.
C_m+s: concentración de muestra + SR.
C_s: concentración de SR

Precisión

Definición

La precisión de un método analítico es el grado de concordancia entre los resultados del ensayo individual cuando el método se aplica repetidamente a varias alícuotas de una muestra homogénea. Está relacionada con la dispersión de las medidas alrededor de su valor medio o central. La precisión de un método analítico generalmente se expresa como la desviación estándar (σ), estimada analíticamente por S o más comúnmente con la desviación estándar relativa o coeficiente de variación (CV).

El estimador S de la desviación estándar se calcula como:

$$S = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}} \quad \text{siendo } \bar{x} = \frac{\sum x_i}{n}, \text{ el estimador de la media poblacional}$$

$$CV = \frac{S \times 100}{\bar{X}}$$

Ambos estimadores, desviación estándar y CV permiten evaluar los errores aleatorios en la estimación de la medida correspondiente a la dispersión de datos alrededor de la media.

La precisión puede ser considerada en tres niveles:

- **Repetibilidad o Precisión Intra-ensayo:** expresa la precisión bajo las mismas condiciones operativas en un intervalo de tiempo corto (mismo analista, mismo día, mismo equipo y condiciones).
- **Precisión intermedia o Precisión Inter-día:** expresa las variaciones intralaboratorio, es decir, distintas condiciones en distintos días, dentro del mismo laboratorio (diferentes días, diferentes analistas, diferentes equipos, etc.)
- **Reproducibilidad o Fortaleza:** expresa la precisión entre laboratorios (estudios colaborativos)

Determinación

La precisión de un método analítico debe estudiarse sobre:

- El **sistema:** se calcula como el coeficiente de variación (CV%) de 6 determinaciones de una misma solución del Estándar del Principio activo, al 100% o de 9 determinaciones (3 a tres concentraciones)
- El **método:** se calcula como el CV% de 6 muestras de una misma concentración (al 100% o 9 a 3 concentraciones). La evaluación corresponde a todo el procedimiento, desde la preparación de la muestra hasta la medición del analito por parte del instrumento.

Criterio de Aceptación: $CV \leq 2\%$

Sensibilidad: Límite de Detección (LD) Límite de Cuantificación (LC)

La sensibilidad de un método analítico corresponde a la mínima cantidad de analito que puede producir un resultado significativo. Un método es sensible cuando frente a una pequeña variación en la concentración se obtiene una significativa variación en la señal.

Se debe diferenciar claramente entre dos tipos de sensibilidad:

- **Sensibilidad de calibración**, correspondiente a la pendiente de la curva de calibración.
- **Sensibilidad analítica**, correspondiente al cociente entre la sensibilidad de calibración y la desviación estándar de la medida.

Resulta claro que dos técnicas o la misma técnica empleada para diferentes matrices, pueden tener la misma sensibilidad de calibración, pero diferente sensibilidad analítica debida a factores propios como necesidad de extracción, concentración, etc.

Los parámetros a definir al evaluar la sensibilidad de un método son los límites de detección y de cuantificación.

Definiciones

El *límite de detección* es la concentración más baja de analito que puede detectarse, pero no necesariamente cuantificarse, en una muestra bajo las condiciones experimentales establecidas.

El *límite de cuantificación* es la menor concentración de analito que puede determinarse con precisión y exactitud en una muestra, bajo las condiciones experimentales establecidas.

Determinación

Existen diversas maneras para determinar el límite de detección, dependiendo de si se trata de un método no instrumental o instrumental.

- **Para métodos no instrumentales:** ambos límites se determinan por el análisis de muestras con concentraciones conocidas de analito y estableciendo el mínimo nivel al cual el analito puede ser detectado en forma confiable (LD) y el mínimo nivel al cual puede ser cuantificado con precisión y exactitud (LC). Se los suelen llamar Métodos de los Falsos Negativos.
- **Para métodos instrumentales** que exhiben ruido de fondo. Para el *límite de detección* puede efectuarse por comparación con la respuesta de un blanco o placebo, siendo positiva cuando la señal del analito supere la relación señal/ ruido en un factor de 2 o 3. Para el *límite de cuantificación* se mide la señal de fondo (relación señal/ ruido); efectuando mediciones repetidas sobre un blanco o placebo, se mide su desviación estándar y se

calcula el límite de cuantificación multiplicando esa desviación por un factor, generalmente 10. El valor resultante se valida por análisis de un número variable de muestras de concentración cercana al límite fijado.

Dado que la determinación de los límites de detección y de cuantificación supone un trabajo importante, en general sólo se efectúa para el análisis de impurezas o trazas o cuando el rango analítico se encuentra muy próximo al límite de detección. En caso contrario, sólo se estudia la precisión y la exactitud en la menor concentración probable para el analito.

Ambos límites también pueden estimarse a partir de la curva de regresión, siempre que se hayan considerado concentraciones bajas de analito, por extrapolación a cero:

1. Se determina la pendiente (**b**) de la curva de calibración (concentración vs respuesta) en el rango apropiado.
2. Se obtiene otra curva de calibración, cada punto por triplicado, pero en este caso para concentraciones menores de analito, determinándose la ecuación de esta nueva recta de calibración y se extrapola la respuesta a concentración cero, obteniéndose un estimado de la respuesta del blanco: Y_{bl} .
3. Se determina la desviación estándar (**s**) correspondiente a cada concentración del punto 2, se calcula la recta correspondiente a concentración vs **s** y se extrapola como en el caso anterior la desviación estándar a concentración cero, obteniéndose el estimado S_{bl} correspondiente a la desviación estándar del blanco.
4. Se calculan ambos límites para **n'** medidas individuales como:

$$LD = \frac{Y_{bl} + 3S_{bl}}{b\sqrt{n'}} \qquad LC = \frac{Y_{bl} + 10S_{bl}}{b\sqrt{n'}}$$

Cualquiera sea el método empleado, el LD y LC debe ser confirmado por medio del análisis de un número apropiado de muestras con concentraciones similares a los límites hallados.

Robustez

Definición

La robustez de un método analítico es la medida de su capacidad de no verse afectado por variaciones pequeñas, pero deliberadas, en los parámetros del método y proporciona una indicación de su confiabilidad. Ejemplos de variaciones que deben estudiarse durante la evaluación de la robustez son:

- diferentes instrumentos,
- diferentes lotes de reactivos,
- diferentes tiempos de valoración,
- diferentes temperaturas,
- diferentes columnas cromatográficas (distintos lotes o proveedores).

La robustez se expresa como la falta de influencia de las variables operativas y del entorno sobre los resultados del ensayo y dará confianza al método en su aplicación frente a cambios imprevistos en los equipos utilizados, en los analistas encargados de aplicarlo o en otros parámetros que se puedan alterar durante la utilización del mismo.

Determinación

Se determina mediante el análisis de alícuotas a partir de lotes homogéneos empleando condiciones operativas diferentes pero que están dentro de los parámetros específicos en la valoración. El grado de reproducibilidad de los resultados del ensayo se compara con la precisión de la valoración bajo condiciones normales para obtener una medida de la robustez del método analítico.

Valoraciones respetando el diseño habitual:

Mínimo 3 niveles que incluyan a todo el intervalo (80%- 100%- 120%)

Si quisiera modificar todas las variables en cada uno de los ensayos, tendría que realizar numerosos ensayos.

A fin de organizar y disminuir el número de ensayos, se puede diseñar el estudio utilizando una Matriz de Placket-Burman (Diseño de Experimento Multifactorial) donde para (n) variables se realizan (n+1) ensayos.

Diseño de Placket-Burman:

Variables	Número de ensayo							
	1	2	3	4	5	6	7	8
A	a	a	a	a	A	A	A	A
B	b	b	B	B	b	b	B	B
C	c	C	c	C	c	C	c	C
D	d	d	D	D	D	D	d	d
E	E	e	E	e	e	E	e	E
F	F	f	f	F	F	f	f	F
G	G	g	g	G	g	G	G	g
% SVD	s	t	u	v	w	x	y	z

Ensayos: 1,2...8 Variables: A,B...G Parámetros: s,t...z

Para cada variable elijo 2 niveles: por ejemplo (**A**) extremo o alto y (**a**) Nominal o bajo.

Hallar para cada variable evaluada la DP: diferencia promedio:

DP = (Promedio de las valoraciones obtenidas a altos niveles) – (Promedio de las valoraciones obtenidas a bajos niveles).

El criterio de aceptación según este diseño es:

Para cada variable evaluada: $|DP| < SD \sqrt{2}$ (No hay Diferencias Significativas)

(Donde SD: desviación estándar obtenida en el ensayo de repetibilidad)

Ventaja: en un diseño normal de “una variable por vez”, el estudio de 5 variables resultaría en $2^5 = 32$ ensayos, en cambio siguiendo este diseño serían solamente 6 ensayos.

Cálculo de las DP de respuesta para cada parámetro:

Parámetros	Diferencia (DP)
A – a	$DP_A = \frac{1}{4} (w+x+y+z) - \frac{1}{4} (s+t+u+v)$
B – b	$DP_B = \frac{1}{4} (u+v+y+z) - \frac{1}{4} (s+t+w+y)$
C – c	$DP_C = \frac{1}{4} (t+v+x+z) - \frac{1}{4} (s+u+w+y)$
D – d	$DP_D = \frac{1}{4} (u+v+w+x) - \frac{1}{4} (s+t+y+z)$
E – e	$DP_E = \frac{1}{4} (s+u+x+z) - \frac{1}{4} (t+v+w+y)$
F – f	$DP_F = \frac{1}{4} (s+v+w+z) - \frac{1}{4} (t+u+x+y)$
G – g	$DP_G = \frac{1}{4} (s+v+x+y) - \frac{1}{4} (t+u+w+z)$

Recordar: La validez de un método analítico puede comprobarse sólo mediante estudios de laboratorio. En consecuencia, la documentación que avale tales estudios es un requisito básico para determinar si un método es apropiado para una aplicación determinada. Cualquier método analítico propuesto debe estar acompañado de la documentación necesaria.

Aptitud del Sistema (Test de Adecuabilidad o System Suitability Test)

Es una herramienta cuya aplicación permitirá verificar que determinados parámetros instrumentales se mantienen bajo control, confirmando que nuestro sistema en particular, brindará resultados dentro de los límites especificados, es útil ya que son habituales las variaciones en la estabilidad de los reactivos, equipos y analistas, por ejemplo en HPLC la variación del pH de la FM, diferentes lotes de columnas, la temperatura, el flujo, etc.

Los parámetros del Test de Adecuabilidad se deben establecer para cada tipo de método en particular. Su principal aplicación es en métodos cromatográficos. Se emplea para comprobar que la resolución y la reproducibilidad del sistema cromatográfico por HPLC son aptas para realizar el ensayo. Los parámetros de aptitud del sistema se determinan para el pico de la sustancia, a menos que se especifique de otro modo en la monografía correspondiente. Si es necesario, pueden realizarse ajustes en las condiciones operativas para cumplir con los requisitos de aptitud del sistema, entre ellos,

las proporciones de los componentes de la fase móvil y el caudal. La resolución R es una función de la eficiencia de la columna y se especifica para asegurar que las sustancias que eluyan muy cercanas se resuelvan entre sí y para asegurar que los estándares internos se resuelvan de las sustancias a ensayar. La eficiencia de la columna, determinando el Número de Platos Teóricos (N), puede especificarse también como requisito de aptitud del sistema, especialmente si hay solo un pico de interés en el cromatograma, sin embargo, el valor aislado de eficiencia no puede asegurar la resolución para el sistema en estudio. La eficiencia de la columna es una medida de la agudeza de los picos, importante para detectar componentes en baja concentración. Para evaluar si se cumplen los requisitos de aptitud del sistema se realizan inyecciones repetidas de la *Preparación estándar* empleada en la *Valoración* u otra *Solución estándar*. A menos que se especifique de otro modo en la monografía correspondiente, para calcular la desviación estándar relativa (RSD) o Coeficiente de Variación (CV), se emplean los datos de cinco inyecciones repetidas del estándar si el requisito es 2,0% o menor, y seis inyecciones repetidas si el requisito de la desviación estándar relativa es mayor de 2,0% .

El factor de asimetría (A_s) o tailing, una medida de la simetría del pico, es 1 para los picos perfectamente simétricos y su valor aumenta a medida que la asimetría es más pronunciada. En algunos casos, pueden observarse valores menores de la unidad. Como consecuencia de la asimetría del pico, la integración y la precisión se tornan menos confiables.

$A_s = \frac{W_{0,05}}{2 f}$; en el cual $W_{0,05}$ es el ancho del pico al 5% de altura y f es la

distancia entre el borde simétrico del pico y el centro del mismo medida al 5% de la altura.

Estos datos se obtienen a partir de inyecciones repetidas del estándar u otras soluciones según se especifique en la monografía correspondiente.

Métodos para evaluar resultados anómalos

Es sabido que determinaciones repetidas aplicadas sobre una misma muestra no siempre dan resultados concordantes. Para evaluar si estos resultados son anómalos y se los puede rechazar se recurre a diversos test estadísticos como por ejemplo:

- Test de Dixon
- Test de Grubbs

En ambos con la observación sospechosa se calcula un estadístico de prueba, el cual se compara con un valor límite basado en la suposición de un comportamiento aleatorio de los datos.

En el test de Dixon si el valor del estadístico supera el tabulado para una determinada probabilidad, se considera que es poco probable que ese dato se obtenga de un muestreo aleatorio de la población de resultados posibles y por lo tanto se lo considera anómalo.

El test de Grubbs es a la inversa.

Test de Dixon

Aplicado cuando tenemos un solo dato sospechoso.

Se procede de la siguiente manera:

1. Se ordenan los datos obtenidos en forma creciente
2. Si el dato sospechoso es el mayor (X_n), se calcula un estadístico Q:
$$Q = (X_n - X_{(n-1)}) / (X_n - X_1)$$
3. Si el dato sospechoso es el menor (X_1):
$$Q = (X_2 - X_1) / (X_n - X_1)$$
4. Se compara el valor de Q con el valor crítico para (n) grados de libertad
5. Si el valor obtenido es mayor que el crítico se concluye que el dato es anómalo

Test de Grubbs

Aplicado cuando tenemos dos datos sospechosos. Se aplica de la siguiente manera:

1. Se ordenan los datos obtenidos en forma creciente
2. Se calcula la varianza de los mismos eliminando los 2 datos sospechosos
3. Se calcula la varianza para todos los datos
4. Se obtiene el cociente entre ambas varianzas
5. Se compara el valor obtenido con el de tabla para (n) grados de libertad.
6. En este caso como, es un test por disminución, si el valor obtenido es menor que el crítico se concluye que los 2 datos son anómalos

Resumiendo:

- La Validación de un Método Analítico debe ser verificada únicamente por estudios de laboratorio.
- Debe estar adecuadamente documentada.
- Cada parámetro de validación debe determinarse con un Estándar o Sustancia de Referencia.
- La exigencia de uno u otro parámetro dependerá del uso del método, es decir, del destino del método.
- Los métodos Farmacopeicos no deben ser validados, excepto los destinados a Estudios de Estabilidad o Validación de Limpieza.
- Únicamente se les aplicará el Test de Aptitud del Sistema (Test de Adecuabilidad)
- Los métodos se deben Revalidar cuando se introduce algún cambio en el mismo o cuando la matriz y/o la concentración del analito en un producto se ha modificado.

Preguntas Orientadoras

1. Qué métodos analíticos se incluyen en la Categoría II de las Farmacopeas?
2. Si Ud. deseara estudiar la robustez de un método, ¿cómo diseñaría el estudio? Indique qué variables y qué niveles de cada una de ellas elegiría, y la forma general de realizar el ensayo.
3. Describa los métodos que Ud. conoce para evaluar la selectividad de un método analítico.
- 4.Cuál es la Hipótesis Nula (H_0) al aplicar el Test de Student para evaluar Exactitud?

Test de Autoevaluación

1. En la validación de un método analítico destinado al control de una especialidad, qué parámetro debe determinar para evaluar errores inherentes al mismo:
 - (a) Selectividad
 - (b) Límite de cuantificación
 - (c) Exactitud
 - (d) Linealidad
2. En la validación de un método analítico, qué parámetro debe determinar para evaluar si el método es reproducible:
 - (a) Selectividad
 - (b) Límite de cuantificación
 - (c) Exactitud
 - (d) Precisión
3. Qué parámetro debe determinar para evaluar que los excipientes no interfieren:
 - (a) Especificidad

- (b) Límite de cuantificación
 - (c) Exactitud
 - (d) Linealidad
4. Cómo se expresa la Exactitud?
- (a) Desviación estándar
 - (b) Error relativo
 - (c) Pendiente de la curva de calibración
 - (d) Intervalo de confianza
5. La Fortaleza de un método analítico expresa:
- (a) Precisión del Sistema
 - (b) Robustez
 - (c) Reproducibilidad
 - (d) Datos no anómalos
6. La ordenada al origen de una curva de calibración evalúa:
- (a) La dispersión del método
 - (b) La sensibilidad del método
 - (c) La presencia de errores aleatorios
 - (d) La presencia de productos de degradación

Bibliografía

1. Ministerio de Salud – ANMAT. *Farmacopea Argentina*. VII ed. (2003) Buenos Aires.
2. International Conference on Harmonisation (ICH) *Validation of Analytical Procedures: Text and Methology* (2005) Silver Spring.
3. Farmacopea de los Estados Unidos de América (USP 34) (2011) Rockville.
4. Quattrocchi, O.; Abelaira de Andrizzi, S. I.; Laba, R.F. (1992) *Introducción a la HPLC. Aplicación y Práctica*. Buenos Aires: Artes Gráficas Farro