

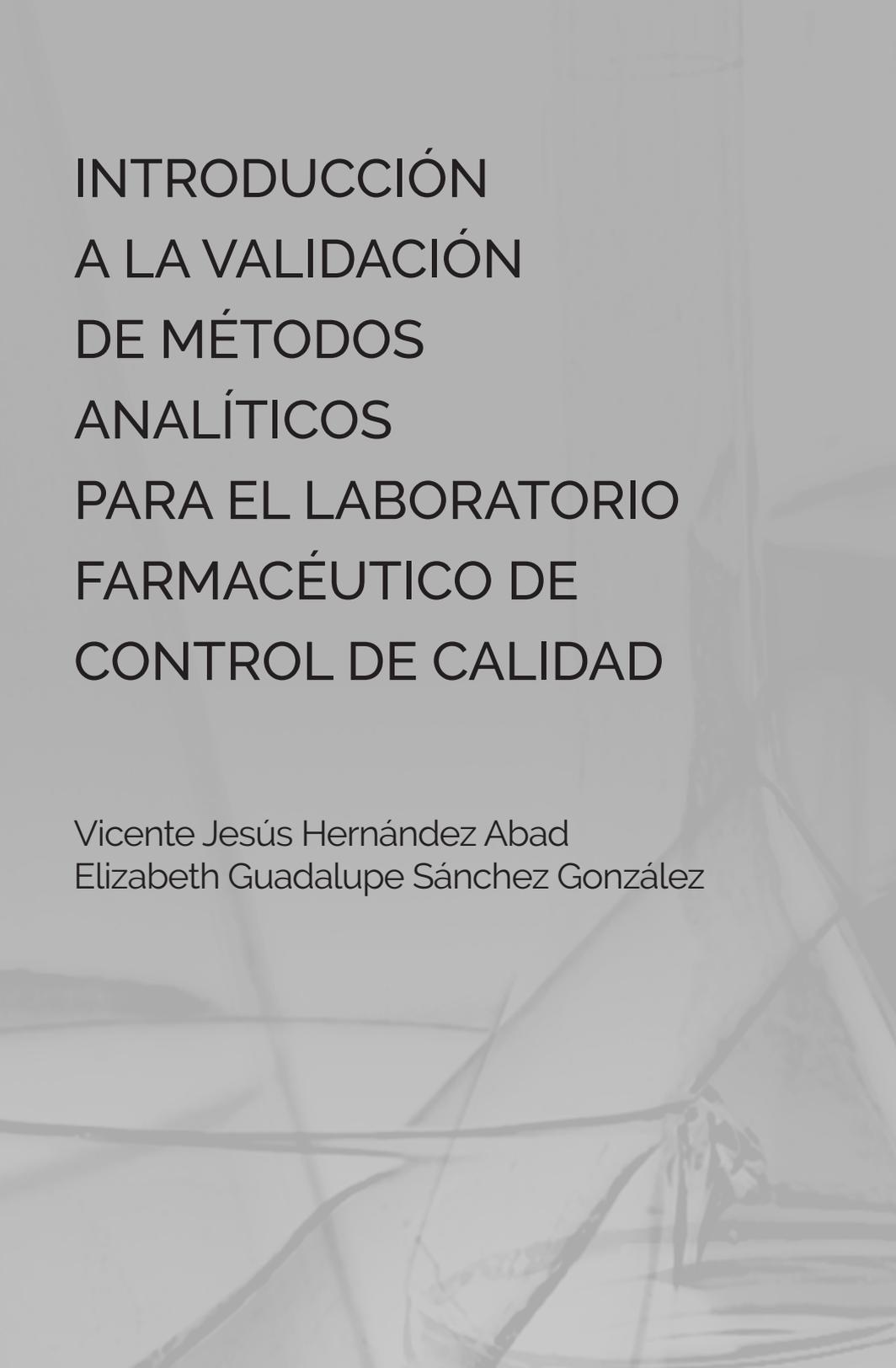
INTRODUCCIÓN A LA VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA EL LABORATORIO FARMACÉUTICO DE CONTROL DE CALIDAD



PAPIME PE200815

Vicente Jesús Hernández Abad
Elizabeth Guadalupe Sánchez González





INTRODUCCIÓN A LA VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA EL LABORATORIO FARMACÉUTICO DE CONTROL DE CALIDAD

Vicente Jesús Hernández Abad
Elizabeth Guadalupe Sánchez González



Datos para catalogación bibliográfica

Autores: Vicente Jesús Hernández Abad y Elizabeth Guadalupe Sánchez González

Introducción a la validación de métodos analíticos para el laboratorio farmacéutico de control de calidad

UNAM, FES Zaragoza, marzo de 2017.
200 pp.

ISBN: 978-607-02-9135-7

Diseño de portada: Carlos Raziel Leños Castillo

Diseño y formación de interiores: Claudia Ahumada Ballesteros.

DERECHOS RESERVADOS

Queda prohibida la reproducción o transmisión total o parcial del texto o las ilustraciones de la presente obra bajo cualesquiera formas, electrónicas o mecánicas, incluyendo fotocopiado, almacenamiento en algún sistema de recuperación de información, dispositivo de memoria digital o grabado sin el consentimiento previo y por escrito del editor.

Introducción a la validación de métodos analíticos para el laboratorio farmacéutico de control de calidad

D.R. © Universidad Nacional Autónoma de México

Av. Universidad # 3000, Col. Universidad Nacional Autónoma de México, C.U.,
Delegación Coyoacán, C.P. 04510, México, D.F.

Facultad de Estudios Superiores Zaragoza

Av. Guelatao # 66, Col. Ejército de Oriente,
Delegación Iztapalapa, C.P. 09230, México, D.F.

Agradecimiento

Este libro es un producto desarrollado como resultado del proyecto PAPIIME PE200815 MEJORA DE LA ENSEÑANZA Y EL APRENDIZAJE DE LA VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS MEDIANTE EL DESARROLLO E IMPLEMENTACIÓN DE MATERIALES EDUCATIVOS INNOVADORES, financiado en su totalidad con recursos del mismo. Se agradece a la Universidad Nacional Autónoma de México, a través de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico por su apoyo para este proyecto.

Índice

Capítulo 1. Validación de Métodos Analíticos. Algunas precisiones necesarias 19

1.1	¿Qué es un Método Analítico?	21
1.2	Validación de Métodos Analíticos: Un concepto	22
1.3	Contexto de la Validación de Métodos Analíticos en las operaciones farmacéuticas	25
1.3.1	¿Por qué validar los Métodos Analíticos?	26
1.3.2	¿Cuándo se debe validar un Método Analítico?	27
1.3.3	¿Qué pruebas deben llevarse a cabo para la Validación de Métodos Analíticos?	30
1.4	Resumen del Capítulo 1	37
1.5	Bibliografía del Capítulo 1	38

Capítulo 2. Cómo asegurar la calidad de los datos para una Validación de Métodos Analíticos exitosa 41

2.1	Calificación de equipos o instrumentos	43
2.1.1	Conocimiento de la incertidumbre de las mediciones	43
2.1.2	Error en las mediciones	48
2.1.3	Elementos de la calificación de equipos e instrumentos Analíticos	51
2.2	Adecuabilidad del Sistema Analítico	52
2.3	Resumen del Capítulo 2	58
2.4	Bibliografía del Capítulo 2	61

Capítulo 3. Características de desempeño analítico demostrables durante la Validación del método 63

3.1	Especificidad del Método Analítico.	65
3.1.1	¿Qué es la Especificidad de un Método Analítico?	65
3.1.2	¿Por qué demostrar la Especificidad de un Método Analítico?	66
3.1.3	¿Para qué tipo de métodos es necesario demostrar la Especificidad?	67
3.1.4	¿Cómo se determina la Especificidad de un Método Analítico?	67
3.1.4.1	Demostración de Especificidad para ensayos de identidad	68
3.1.4.2	Demostración de Especificidad para pruebas de impurezas	70
3.1.4.3	Demostración de la Especificidad en métodos para valoración	72
3.2	Linealidad del Método Analítico	78
3.2.1	¿Qué es la Linealidad de un Método Analítico?	78
3.2.2	¿Por qué demostrar la Linealidad de un Método Analítico?	78
3.2.3	¿Para qué tipo de métodos se lleva a cabo la demostración de Linealidad?	79
3.2.4	¿Cómo se determina la Linealidad de un Método Analítico?	79
3.3	Precisión del Método Analítico	92
3.3.1	¿Qué es la precisión del Método Analítico?	92
3.3.2	¿Por qué demostrar la precisión de un Método Analítico?	93
3.3.3	¿Para qué tipo de métodos se lleva a cabo la demostración de precisión?	94
3.3.4	¿Cómo se determina la precisión de un Método Analítico?	94
3.3.4.1	Demostración de la repetibilidad del Método Analítico	94
3.3.4.2	Demostración de la Precisión Intermedia del Método Analítico	97
3.3.4.3	Demostración de la Reproducibilidad del Método Analítico	109
3.4	Exactitud del Método Analítico	114
3.4.1	¿Qué es la Exactitud del Método Analítico?	114
3.4.2	¿Por qué demostrar la Exactitud de un Método Analítico?	114
3.4.3	¿Para qué tipo de métodos se lleva a cabo la demostración de Exactitud?	115

3.4.4	¿Cómo se determina la Exactitud de un Método Analítico?	115
3.4.4.1	Determinación de Exactitud para un Método Analítico aplicado a la valoración de una materia prima	116
3.4.4.2	Determinación de Exactitud para un Método Analítico aplicado a la valoración del contenido de un analito en un medicamento	122
3.4.4.3	Determinación de Exactitud para un Método Analítico aplicado a la cuantificación de impurezas	123
3.5	Límite de Detección del Método Analítico	123
3.5.1	¿Qué es el Límite de Detección del Método Analítico?	123
3.5.2	¿Por qué demostrar el Límite de Detección de un Método Analítico?	124
3.5.3	¿Para qué tipo de métodos se lleva a cabo la demostración de Límite de Detección?	124
3.5.4	¿Cómo se determina el Límite de Detección de un Método Analítico?	125
3.6	Límite de Cuantificación del Método Analítico	131
3.6.1	¿Qué es el Límite de Cuantificación del Método Analítico?	131
3.6.2	¿Por qué demostrar el Límite de Cuantificación de un Método Analítico?	131
3.6.3	¿Para qué tipo de métodos se lleva a cabo la demostración de Límite de Cuantificación?	132
3.6.4	¿Cómo se determina el Límite de Cuantificación de un Método Analítico?	133
3.7	Robustez del Método Analítico	135
3.7.1	¿Qué es la Robustez del Método Analítico?	135
3.7.2	¿Por qué demostrar la Robustez de un Método Analítico?	135
3.7.3	¿Para qué tipo de métodos se lleva a cabo la demostración de Robustez?	138
3.7.4	¿Cómo se determina la Robustez de un Método Analítico?	138
3.7.4.1	Determinación de Robustez durante la etapa de desarrollo del Método Analítico	138
3.7.4.2	Determinación de Robustez durante la etapa de Validación del Método Analítico	140
3.8	Tolerancia del Método Analítico	154
3.8.1	¿Qué es la Tolerancia del Método Analítico?	154
3.8.2	¿Por qué demostrar la Tolerancia de un Método Analítico?	154
3.8.3	¿Para qué tipo de métodos se lleva a cabo la demostración de Tolerancia?	155
3.8.4	¿Cómo se determina la Tolerancia de un Método Analítico?	155

3.9	Resumen del Capítulo 3	157
-----	------------------------	-----

3.10	Bibliografía del Capítulo 3	168
------	-----------------------------	-----

Capítulo 4. Documentación para la planeación, ejecución y conclusión de la Validación de Métodos Analíticos para el laboratorio farmacéutico de Control de Calidad	173
---	------------

4.1	Alcance y contenidos generales del protocolo de Validación de un Método Analítico	175
-----	---	-----

4.2	Aspectos a considerar en protocolos de Validación de Métodos Analíticos de acuerdo con su aplicación y objetivo	176
-----	---	-----

4.2.1	Protocolo de Validación de Métodos Analíticos para ensayos de identidad	176
-------	---	-----

4.2.1.1	Demostración de Especificidad para el ensayo de identidad	177
---------	---	-----

4.2.2	Protocolo de Validación de Métodos Analíticos para pruebas límite de impurezas	177
-------	--	-----

4.2.2.1	Demostración de Especificidad para pruebas límite de impurezas	179
---------	--	-----

4.2.2.2	Demostración de Límite de Detección para pruebas límite de impurezas	179
---------	--	-----

4.2.3	Protocolo de Validación de Métodos Analíticos para cuantificación de impurezas	181
-------	--	-----

4.2.3.1	Demostración de Especificidad para pruebas cuantitativas de impurezas	182
---------	---	-----

4.2.3.2	Demostración de Linealidad para pruebas cuantitativas de impurezas	183
---------	--	-----

4.2.3.3	Demostración de Exactitud para pruebas cuantitativas de impurezas	184
---------	---	-----

4.2.3.4	Demostración de precisión para pruebas cuantitativas de impurezas	185
---------	---	-----

4.2.3.5	Demostración de Límite de Cuantificación/Límite de Detección para pruebas cuantitativas de impurezas	187
---------	--	-----

4.2.4	Protocolo de Validación de Métodos Analíticos para valoración	188
4.2.4.1	Demostración de Especificidad para Métodos Analíticos para valoración	188
4.2.4.2	Demostración de Linealidad para métodos para valoración de contenido	188
4.2.4.3	Demostración de Exactitud en Métodos Analíticos para valoración	189
4.2.4.4	Demostración de precisión en Métodos Analíticos para valoración	190
4.2.4.5	Demostración de Robustez para los diferentes tipos de métodos	192
4.3	Planeación y ejecución del estudio de Validación	193
4.3.1	Análisis de tiempo y recursos necesarios	193
4.3.2	Determinación del orden de los experimentos a realizar	193
4.3.3	Ejecución del estudio de Validación	193
4.4	Reporte de resultados de la Validación	195
4.5	Resumen del Capítulo 4	196
4.6	Bibliografía del Capítulo 4	197

Índice de Tablas

Capítulo 1. Validación de Métodos Analíticos. Algunas precisiones necesarias

Tabla 1.1 Características de desempeño analítico recomendadas para validar un método de acuerdo con la FEUM	35
Tabla 1.2 Características de desempeño analítico recomendadas para validar un método de acuerdo con la guía Q2 de ICH	36

Capítulo 2. Cómo asegurar la calidad de los datos para una Validación de Métodos Analíticos exitosa

Tabla 2.1 Resultados analíticos obtenidos por cada alumnos en el análisis de indometacina en tabletas	49
Tabla 2.2 Clasificación de los equipos de laboratorio de acuerdo con la complejidad en los procesos para calificarlos	53
Tabla 2.3 Ejemplo de la determinación de Precisión del Sistema para un método analítico por CLAR	56

Capítulo 3. Características de desempeño analítico demostrables durante la Validación del método

Tabla 3.1 Resultados de la determinación de Especificidad de un método espectrofotométrico para la valoración de un fármaco	75
Tabla 3.2 Intervalos de trabajo recomendados en métodos analíticos de rutina	80
Tabla 3.3 Resultados de la determinación de Linealidad de un método para la valoración de un principio activo por Espectrofotometría UV	85

Tabla 3.4 Resultados obtenidos de la regresión respuesta vs concentración con los datos de la Tabla 3.3	88
Tabla 3.5 Ejemplo de la determinación de repetibilidad para un Método Analítico utilizado para la valoración de un fármaco en tabletas por Espectrofotometría UV	96
Tabla 3.6 Determinación de Precisión Intermedia de acuerdo con los criterios de la FEUM para un Método Analítico utilizado para la valoración de un fármaco en tabletas por Espectrofotometría UV	98
Tabla 3.7 Determinación de Precisión Intermedia de acuerdo con los criterios de la FEUM para un Método Analítico utilizado para la valoración de un fármaco en tabletas por Espectrofotometría UV, ejemplo 2	99
Tabla 3.8 Análisis de varianza del modelo de efectos fijos para demostrar Precisión Intermedia	102
Tabla 3.9 Análisis de varianza del modelo de efectos fijos para demostrar Precisión Intermedia, utilizando los datos de la Tabla 3.6	104
Tabla 3.10 Análisis de varianza del modelo de efectos fijos para demostrar Precisión Intermedia, utilizando los datos de la Tabla 3.7	105
Tabla 3.11 Análisis de varianza del modelo de efectos fijos para demostrar Precisión Intermedia con un factor anidado	108
Tabla 3.12 Análisis de varianza del modelo de efectos fijos para demostrar Precisión Intermedia, utilizando los datos de la Tabla 3.7, con el factor día anidado en el factor analista	109
Tabla 3.13 Análisis de varianza del modelo de efectos fijos para demostrar Reproducibilidad	111
Tabla 3.14 Determinación de Reproducibilidad para un Método Analítico utilizado para la valoración de un fármaco en tabletas por Espectrofotometría UV	112

Tabla 3.15 Análisis de varianza del modelo de efectos fijos para demostrar Reproducibilidad	113
Tabla 3.16 Resultados de la determinación Exactitud para un método usado para la valoración de un fármaco por Espectrofotometría UV	118
Tabla 3.17 Cálculo de t de Student para la determinación de Exactitud con los datos de la Tabla 3.16	119
Tabla 3.18 Determinación de impurezas en un fármaco nuevo	127
Tabla 3.19 Relación señal-ruido para los cromatogramas de la Figura 3.8	128
Tabla 3.20 Valores de concentración vs respuesta para la determinación de Limite de Detección y Limite de Cuantificación de un Método Analítico por CLAR en fase reversa	129
Tabla 3.21 Resultados de la regresión lineal por mínimos cuadrados de la Tabla 3.20	130
Tabla 3.22 Factores que podrían considerarse críticos durante un estudio de Robustez	137
Tabla 3.23 Diseño de experimentos para el desarrollo de un Método Analítico por CLAR para la valoración de un fármaco como materia prima	139
Tabla 3.24 Factores a considerar en un estudio de Robustez de un Método Analítico por Espectrofotometría UV	141
Tabla 3.25 Factores a considerar en un estudio de Robustez de un Método Analítico por CLAR	145
Tabla 3.26 Diseño Plackett-Burman para examinar 11 factores en 12 experimentos, a partir de los datos de la Tabla 3.25	146
Tabla 3.27 Resultado de los experimentos planteados en la Tabla 3.26 y contrastes calculados para cada factor	148

Tabla 3.28 Valores de F calculada para cada factor probado en el diseño propuesto en la Tabla 3.26	150
Tabla 3.29 Resultados de un estudio de estabilidad de muestras analíticas	152

Capítulo 4. Documentación para la planeación, ejecución y conclusión de la Validación de Métodos Analíticos para el laboratorio farmacéutico de Control de Calidad

Tabla 4.1 Propuesta de protocolo resumido para la demostración de selectividad para ensayos de identidad	178
Tabla 4.2 Propuesta de protocolo resumido para la demostración de Especificidad para pruebas límite de impurezas	180
Tabla 4.3 Propuesta de protocolo resumido para la demostración de Límite de Detección para pruebas límite de impurezas	181
Tabla 4.4 Propuesta de protocolo resumido para la demostración de Especificidad para pruebas cuantitativas de impurezas o para métodos para valoración de contenido	182
Tabla 4.5 Propuesta de protocolo resumido para la demostración de Linealidad para pruebas cuantitativas de impurezas	183
Tabla 4.6 Propuesta de protocolo resumido para la demostración de Exactitud para pruebas cuantitativas de impurezas	184
Tabla 4.7 Propuesta de protocolo resumido para la demostración de precisión para pruebas cuantitativas de impurezas	186
Tabla 4.8 Propuesta de protocolo resumido para la demostración de Límite de Detección y Límite de Cuantificación para pruebas cuantitativas de impurezas	187
Tabla 4.9 Propuesta de protocolo resumido para la demostración de Linealidad para valoración de contenido	189

Tabla 4.10 Propuesta de protocolo resumido para la demostración de Exactitud en métodos para valoración de contenido	190
Tabla 4.11 Propuesta de protocolo resumido para la demostración de precisión en Métodos Analíticos para la valoración de contenido	191
Tabla 4.12 Propuesta de protocolo resumido para la demostración de Robustez	192

Índice de Figuras

Capítulo 1. Validación de Métodos Analíticos. Algunas precisiones necesarias

Figura 1.1 Proceso de decisión con respecto a la calidad de un producto, derivada del análisis de la muestra	22
Figura 1.2 Componentes de la calidad de datos en los métodos analíticos ⁷	25
Figura 1.3 Ciclo de vida del Método Analítico (adaptación propia a partir del texto de McPolin)	28

Capítulo 2. Cómo asegurar la calidad de los datos para una Validación de Métodos Analíticos exitosa

Figura 2.1 Diagrama de un Método Analítico para determinar la pureza de un fármaco en una muestra	45
Figura 2.2 Posibles fuentes de incertidumbre para el método propuesto en el diagrama de la Figura 2.1	46
Figura 2.3 Diagrama de dispersión de los resultados obtenidos del análisis de indometacina en tabletas	50

Capítulo 3. Características de desempeño analítico demostrables durante la Validación del método

Figura 3.1 Región de los espectros de Infrarrojo de la sustancia de referencia glibenclamida (A), dos muestras que la contienen (B y C) y su producto de degradación (D)	69
--	----

Figura 3.2 Cromatogramas de sustancia de referencia glibenclamida (A), muestra de glibenclamida (B), glibenclamida sometida a luz blanca (C) y glibenclamida sometida a pirólisis a 200 °C (D)	70
Figura 3.3 Cromatograma del ibuprofeno (B) y su producto de degradación en medio alcalino (A), constituyen el par crítico en la separación cromatográfica	71
Figura 3.4 Diagrama de dispersión de los resultados de la Tabla 3.2	86
Figura 3.5. Gráfica de residuales para los datos de la Tabla 3.2	92
Figura 3.6 Gráfica de interacción de factores analista-día, generada con el programa Statgraphics Centurion XVII	106
Figura 3.7 Cromatogramas de glibenclamida en concentraciones de 1 (A), 0.1 (B) y (0.05) C mg/mL	126
Figura 3.8 Ejemplo de la "trompeta de Horwitz"	132
Figura 3.9 Diagrama de Pareto estandarizado para el diseño de experimentos mostrado en la Tabla 3.23	140

Prefacio

Los conceptos de Validación de Métodos Analíticos son indispensables para el desempeño profesional del Farmacéutico, independientemente del área laboral en la que se desempeñe.

En nuestra experiencia docente de casi veinte años, hemos observado que introducir a los estudiantes en los conceptos de Validación de Métodos Analíticos no es una tarea fácil, debido a factores múltiples, entre los que se encuentran:

- a) Una formación estadística lejana en tiempo en cuanto al semestre de impartición del módulo correspondiente, y lejana conceptualmente por el abordaje no farmacéutico que se le da a los contenidos del módulo.
- b) La bibliografía existente se ha desarrollado para quienes ya aplican los conceptos en su práctica laboral cotidiana, y no para quienes desean aprenderlos.
- c) Si se revisan de manera conjunta diversas fuentes de información, es probable que el alumno se enfrente a discrepancias de concepto o de interpretación del mismo, que le generarán dudas si no tiene todavía el sustento teórico necesario para contrastar la información y traducir el concepto en la aplicación requerida.

Por lo anterior, los autores de este texto consideramos necesario brindar al estudiante un texto con el que, en un nivel adecuado de explicación, con ejemplos reales e interpretaciones claras de las herramientas estadísticas, se aproxime a los conceptos de Validación de Métodos Analíticos aplicados en el laboratorio de control de calidad farmacéutico, no abordando en este libro los métodos bioanalíticos o los indicadores de estabilidad, cuyas particularidades, consideramos, son motivo de otro texto y fuentes adicionales que sobrepasan el nivel de comprensión deseado en un primer acercamiento a estos tópicos,

Dr. Vicente Jesús Hernández Abad
Dra. Elizabeth Guadalupe Sánchez González
Autores

Capítulo 1

Validación
de Métodos
Analíticos.
Algunas
precisiones
necesarias



Resulta innegable, que los farmacéuticos fundamentamos nuestro quehacer profesional en la ciencia y su método. Desde el inicio de nuestros estudios profesionales, somos conminados por los profesores que se hacen cargo de nuestra enseñanza para que llevemos a cabo un análisis minucioso de la información a nuestro alrededor. Para tratar de resolver los temas de interés en nuestra formación, y una vez que hemos realizado ese análisis, se nos invita a plantear preguntas que puedan ser resueltas a través de una serie de procesos, concatenados o no, que a su vez nos llevan a establecer métodos precisos de obtención de la información (experimental o de otra índole), que nos permita, una vez concluida la etapa de recolección de datos, llegar a una conclusión lo más apegada posible a la realidad que nos permiten los resultados generados. La contrastación de esta información se hace, inequívocamente, a partir del análisis científico de la evidencia (siempre documentada), tratando de relacionarla con un criterio de aceptación o con un parámetro establecido *a priori* con respecto a la magnitud o resultado esperado para dicha información.

Con base en lo planteado en el párrafo anterior, no es de extrañar que los profesionales que nos dedicamos a la enseñanza de la Validación de Métodos Analíticos, y en particular los autores de este libro, estemos convencidos de que el concepto de Validación nos acompaña desde el inicio de nuestra formación como farmacéuticos, y que es un tema inherente a nuestro quehacer cotidiano, independientemente del área profesional en la que se desempeñe.

1.1 ¿Qué es un Método Analítico?

De acuerdo con la publicación técnica del Centro Nacional de Metrología CNM-MRD-PT-030¹, que se fundamenta en las directrices de la ISO 8402:1994, un **método de medición** es una "**secuencia lógica de operaciones, descrita genéricamente, utilizada en el desarrollo de las mediciones**". Una **medición** es un "**conjunto de operaciones que tienen por objeto determinar un valor de una magnitud**", y un **mensurando** es una "**magnitud particular sujeta a medición**".

Derivado de la regulación estadounidense, en la guía Q2 de la International Conference on Harmonization (ICH), un procedimiento analíticoⁱ (Método Analítico) se refiere a la forma de llevar a cabo el análisis. Deben describirse

ⁱ Traducción libre del texto original: "Validation means confirmation by examination and provision of objective evidence that the particular requirements for a specific intended use can be consistently fulfilled".

con detalle los pasos necesarios para realizar cada ensayo analítico. Esto puede incluir, pero no está limitado a: la muestra, el estándar de referencia y la preparación de los reactivos, el uso de aparatos, la generación de la curva de calibración, el uso de fórmulas para el cálculo, etc².

Una muestra analítica se compone de dos elementos principales: **el analito** (o la sustancia de interés en la medición, el mensurando) **y la matriz** (los componentes que forman parte de la muestra, los cuales no se requiere determinar o cuantificar, pero que sí afectan al Método Analítico en los procesos de separación necesarios previos al análisis del analito). La medición de una determinada magnitud en una muestra de interés farmacéutico, tiene que ver con la necesidad de demostrar que, en dicha muestra, se cumple efectivamente con alguna de las propiedades o características del producto, con lo que se satisfarán los criterios de calidad del mismo. **La determinación cuali o cuantitativa del analito, permitirá obtener un resultado que, a su vez, será fundamento de una decisión con respecto a la aceptación (o no) de la calidad del producto que se analiza, por lo que debe ser lo más confiable posible** (Figura 1.1).

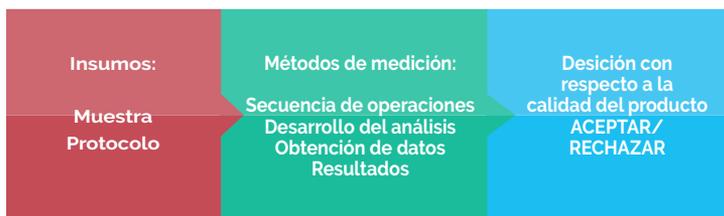


Figura 1.1 Proceso de decisión con respecto a la calidad de un producto, derivada del análisis de la muestra.

1.2 Validación de métodos analíticos: un concepto

En el ámbito farmacéutico, las muestras de interés analítico que podemos encontrar se enlistan de manera no limitativa a continuación³:

- Fármacos o excipientes a granel.
- Medicamentos en proceso o a granel.
- Productos farmacéuticos terminados.
- Muestras de líquido de limpieza de instalaciones o equipos.

- Aguas residuales de los procesos farmacéuticos.
- Fluidos biológicos.

Es muy claro que, independientemente de su naturaleza, el analista farmacéutico debe tener certeza de al menos tres aspectos fundamentales en la determinación de la presencia, de la cantidad de un fármaco o cualquier analito de interés farmacéutico en la muestra, o de ambas:

- Aspecto fundamental 1: Debe tenerse certeza de que se mide lo que se quiere medir en realidad.
- Aspecto fundamental 2: Debe tenerse certeza, de que lo que se mide, se mide en la cantidad correcta.
- Aspecto fundamental 3: Debe tenerse certeza, de que cada vez que se utilice la misma metodología para medir la presencia, la cantidad de un analito en una muestra, o ambas, se obtendrán resultados consistentes.

A partir de lo anterior, resulta entonces indispensable el contar con alguna herramienta (o, mejor dicho, una serie de herramientas) que permitan al analista tener certeza de los aspectos fundamentales enumerados. Esta herramienta, o serie de herramientas, es la Validación de Métodos Analíticos. Para desarrollar un concepto académico y asimilable del término Validación de Métodos Analíticos, es necesario partir de algunas definiciones, mismas que se transcriben a continuación:

La Real Academia de la Lengua Española, en su diccionario vigente, define el término validar como: "Dar fuerza o firmeza a algo, hacerlo válido", toda vez que dicho término proviene del verbo latino *validare*, que es equivalente a "fortificar"⁴.

De acuerdo con la publicación técnica del Centro Nacional de Metrología CNM-MRD-PT-030¹, la Validación es la "confirmación mediante examen y suministro de evidencia objetiva de que se cumplen los requisitos particulares para un uso específico previsto".

En lo referente a la regulación internacional (CFR 21 parte 820)⁵, la Validación es la confirmación a través de la provisión y examen de la evidencia objetiva de que los requerimientos particulares para un uso específico que se intenta pueden ser cubiertos en su totalidadⁱⁱ.

ii Traducción libre del texto original: "Validation of an analytical procedure is the process by which it is established, by laboratory studies, that the performance characteristics of the procedure meet the requirements for the intended analytical applications".

En el ámbito de las Ciencias Farmacéuticas, y con apego a la normatividad nacional, la Norma Oficial Mexicana 059⁶, se denomina Validación "a la evidencia documental generada a través de la recopilación y evaluación de los datos obtenidos en la calificación y de las pruebas específicas, basadas en conocimiento del proceso, sistema o método, para demostrar funcionalidad, consistencia y Robustez". En la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM), la Validación de un Método Analítico se define como "el proceso que establece, mediante estudios de laboratorio; que las características de desempeño del método, satisfacen los requisitos para su aplicación analítica"⁷. En la United States Pharmacopea (USP), la Validación de Métodos Analíticos se define como "'el proceso mediante el cual se establece, por estudios de laboratorio, que las características de desempeño del procedimiento cumplen los requerimientos para la aplicación analítica que se intenta"^{iii 8}.

A partir de las definiciones anteriores, puede establecerse un concepto de **Validación de Métodos Analíticos**, definiéndola como: **la demostración, mediante la recopilación, análisis y evaluación objetiva de la evidencia obtenida a partir de pruebas de desempeño específicas, de que un procedimiento o Método Analítico puede ser utilizado o aplicado en el análisis de un analito dentro de una determinada muestra**. Como podrá notarse, en este concepto cobra especial interés la recopilación, análisis y evaluación de evidencia. Dicha evidencia, es resultado de una serie de procesos experimentales y estadísticos bien definidos en cuanto a su metodología, resultados y contrastación. La definición de los alcances de dichos procesos y su análisis, es establecida desde la etapa de planeación de la Validación de Métodos Analíticos. Un aspecto que no forma parte de la definición, pero sí es de gran relevancia en el concepto mismo de Validación, es que esta es un elemento toral en la calidad de los datos que llevan, como ya se mencionó anteriormente, a una buena toma de decisiones (Figura 1.2).

ii Traducción libre del texto original: "Validation of an analytical procedure is the process by which it is established, by laboratory studies, that the performance characteristics of the procedure meet the requirements for the intended analytical applications".

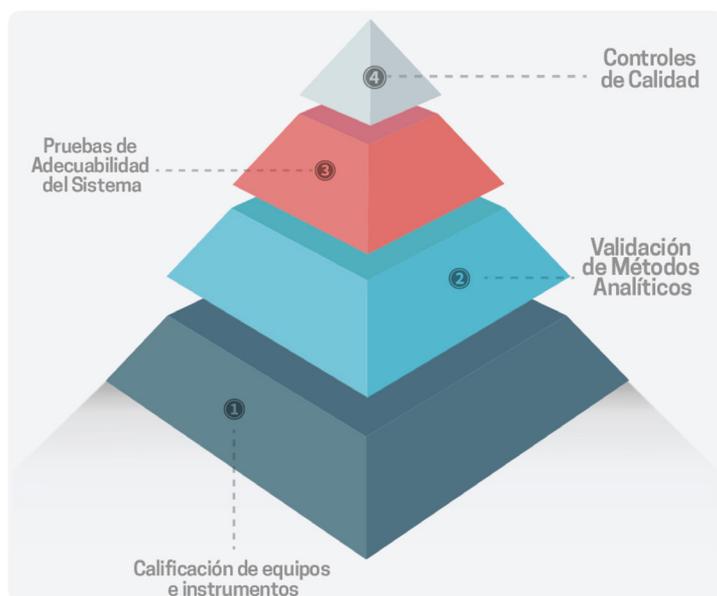


Figura 1.2 Componentes de la calidad de datos en los métodos analíticos⁷.

1.3 Contexto de la validación de métodos analíticos en las operaciones farmacéuticas

La Validación, en términos generales, es una función crítica dentro de las operaciones llevadas a cabo durante el desarrollo, producción y determinación de la calidad o desempeño de los fármacos y medicamentos. La Norma Oficial Mexicana 059⁶, reglamenta diferentes tipos de Validación, dentro de los que se encuentran:

- Validación de Sistemas Computacionales que Impactan la Calidad del Producto.
- Validación de Sistemas Críticos.
- Validación de Procedimientos o Métodos de Limpieza.
- Validación de Procesos de Producción y Acondicionamiento.
- Validación de Métodos Analíticos.

La Validación de Métodos Analíticos no puede separarse del contexto de los diferentes tipos de Validación indispensables en el Sistema de Gestión de la Calidad del establecimiento donde se producen los medicamentos o fármacos, ya que se documenta, de acuerdo con la NOM 059⁶, desde el Plan Maestro de Validación. Sin embargo, para su estudio particular, en el marco de este documento, nos limitaremos específicamente a la definición y explicación de este tipo de Validación.

1.3.1 ¿Por qué validar los Métodos Analíticos?

De manera general, la Validación, como función crítica dentro de las operaciones farmacéuticas, tiene como finalidad asegurar que la calidad del producto se construye de manera paulatina y sostenida, y que no solamente se prueba al final de los procesos encaminados a la obtención del medicamento⁹.

Un método de análisis, como todos los procesos dentro de las operaciones farmacéuticas, tiene un ciclo de vida determinado⁹. Este ciclo de vida comprende las etapas definidas en la Figura 1.3.

De acuerdo con la Figura 1.3, y desde el contexto de las operaciones en un establecimiento dedicado a la producción de medicamentos, no puede concebirse el uso de un método nuevo o de un método adaptado sin que se lleve a cabo la Validación de Métodos Analíticos. Como tal, la Validación de Métodos Analíticos "se diseña", en el entendido de que con un Método Analítico se desea obtener un resultado- como puede ser la comprobación de la presencia de un fármaco, la existencia de una impureza, la cantidad en la que está presente, o todas a la vez, dentro de una muestra- que permitirá al usuario del método (de manera directa el analista o, indirectamente, el responsable del área de aseguramiento de la calidad) tomar una decisión con respecto a la aprobación o rechazo del producto de una etapa de un proceso (o del resultado final de una serie de procesos consecutivos). Lo mínimo que se espera de esta decisión, naturalmente, es que sea correcta, con base tanto en la experiencia de quien la toma, como en la certeza técnica de que el método sirve para el objetivo para el que fue diseñado y es aplicado, a la luz de las especificaciones para el producto en análisis. La certeza técnica de los resultados del análisis depende, al menos, del aseguramiento de tres factores fundamentales, a saber¹⁰:

- a. La calificación de los instrumentos analíticos empleados para la medición, que se fundamenta en la evidencia documentada de que un instrumento opera de manera adecuada y que se ha calibrado y mantenido de manera correcta.

- b. Las pruebas de Adecuabilidad del Sistema analítico, que son requeridas para demostrar que el Método Analítico propuesto puede desempeñarse de manera correcta en el tiempo en el que se realice el análisis en el instrumento especificado, y
- c. La Validación de los Métodos Analíticos.

En este sentido, esperamos cumplir con los atributos de calidad de la Validación de Métodos Analíticos que hemos definido anteriormente, para evitar tomar una decisión incorrecta, derivada de la aplicación de un método cuya funcionalidad no se ha demostrado. Dicho de otra manera más sencilla, **validamos los métodos de análisis porque, de no hacerlo, tendríamos una gran incertidumbre con respecto a las decisiones tomadas con base en los resultados de un procedimiento analítico cuya utilidad o funcionalidad no conocemos, aun cuando los instrumentos para el análisis se encuentren calibrados o los equipos calificados en cuanto a su correcto desempeño.**

1.3.2 ¿Cuándo se debe validar un Método Analítico?

Si regresamos al ciclo de vida del Método Analítico expuesto en la Figura 1.3, nos daremos cuenta de que la Validación de Métodos Analíticos parece ser (y, en realidad, es) una condición sin la cual no se podría utilizar el método de análisis con la confianza de que sus resultados serán correctos. Queda claro que los Métodos Analíticos desarrollados en el sitio de aplicación, deben ser validados inequívocamente, porque un procedimiento analítico original requerirá, con base en su propio ciclo de vida, que se verifique que será útil para el propósito deseado. Partimos del hecho simple de que, **un procedimiento posterior al desarrollo de un Método Analítico será, de manera inequívoca, la Validación del mismo.**

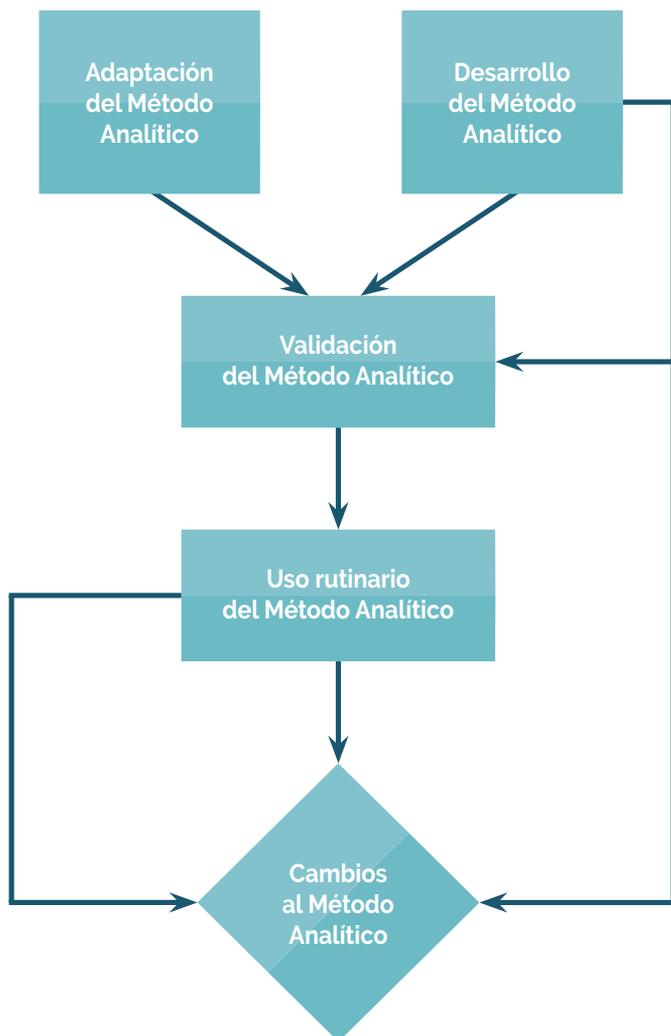


Figura 1.3 Ciclo de vida del Método Analítico (adaptación propia a partir del texto de McPolin10).

Un caso especial en el tema de la Validación de Métodos Analíticos está representado por los análisis que se encuentran descritos en la Farmacopea. Es una realidad, que muchos profesionales de las Ciencias Farmacéuticas mencionan que, tanto en la NOM 059⁶ como en la FEUM⁷ y en la USP⁸, se establece que los Métodos Analíticos descritos en la Farmacopea no requieren ser validados, por lo que se genera confusión en el estudiante que se enfrenta por primera vez a la comprensión de este tema. La aseveración mencionada es correcta, toda vez que se deja de lado la continuación de la oración establecida en la Introducción del Apéndice III de la FEUM⁷, que a la letra dice: "Los Métodos Analíticos de la FEUM⁷ no requieren ser validados, sino únicamente verificar su aplicabilidad al producto, bajo las condiciones de operación del laboratorio y en función del propósito analítico deseado"⁶. En este orden de ideas, es importante establecer el concepto de Verificación del Método Analítico, que se refiere a "la confirmación mediante la aportación de evidencia de que se han cumplido los requisitos especificados. La confirmación puede comprender acciones tales como la realización de ensayos/pruebas y demostraciones". Partiendo de lo anterior, cuando un Método Analítico es propuesto a la Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (CPFEUM), dicha propuesta debe venir acompañada de la fundamentación técnica, que incluya la documentación pertinente, para que la CPFEUM tome la decisión con respecto a su incorporación a la FEUM⁷ **en función de los resultados de la Validación del método propuesto**; esta decisión, está acompañada de la verificación documental de los resultados y puede, adicionalmente, llevarse a cabo un estudio de tipo colaborativo entre laboratorios para que, una vez que se evalúan los resultados analíticos en diferentes laboratorios, tener certeza de la funcionalidad del método. **Es decir, un Método Analítico descrito en la farmacopea no se valida dentro del laboratorio usuario, toda vez que la Validación del mismo ya se realizó por quien lo propuso y la CPFEUM avala, a partir de la verificación documental y, si es requerido, experimental, que el método puede ser utilizado o aplicado en el análisis de una sustancia dentro de una determinada muestra de interés farmacéutico.** El laboratorio usuario del método sólo verificará, experimentalmente, que el Método Analítico es aplicable al producto bajo las condiciones de operación en el laboratorio, en función del propósito analítico deseado; en cualquier caso, estamos frente a un proceso equivalente al de la transferencia de un Método Analítico, y la verificación dependerá en su magnitud y extensión de los parámetros de los que se quiera tener certeza para la aplicación del método.

Otro concepto importante a considerar es la **Transferencia de Métodos Analíticos**. **Esta se refiere a un proceso documentado que permite calificar a un laboratorio (el que recibe el método) para utilizar un**

Método Analítico que se desarrolló en otro laboratorio (laboratorio de origen). La idea de ello es mantener el estado validado del método. Esta transferencia se puede realizar considerando:

- 1) Un análisis comparativo utilizando lotes homogéneos de la muestra (lo que, más adelante, será revisado como determinación de Reproducibilidad),
- 2) Co-validando el método entre los laboratorios, o
- 3) Re-validando el método en el laboratorio receptor.

En este caso, se establece de manera clara el protocolo de transferencia del método, y los procesos que se deben llevar a cabo para la misma, que pueden ir desde una verificación hasta la completa Validación del método.

Para finalizar esta sección, es de suma importancia hacer notar que, cuando un método validado sufre un cambio significativo en su procedimiento, cuando un método detallado en la farmacopea se aplica para un producto diferente para aquel para el que fue diseñado (por ejemplo, aplicar un método para la valoración del principio activo como materia prima para valorar dicho activo en tabletas), o cuando la composición del producto al que se aplica el método de análisis cambia significativamente, se requiere evaluar y, muy seguramente, decidir sobre validar el método de nueva cuenta⁷⁻¹¹⁻¹².

1.3.3 ¿Qué pruebas deben llevarse a cabo para la Validación de Métodos Analíticos?

En este apartado, nos referiremos únicamente a los Métodos Analíticos de rutina en el laboratorio, definidos en la USP como métodos compendiales⁸, sin considerar a los Métodos Analíticos que tienen como fin determinar la cantidad de un analito en un fluido biológico y que son utilizados para estudios de farmacocinética o biodisponibilidad, ni a aquellos métodos cuyo objetivo es ser indicativos de la estabilidad de un medicamento, toda vez que la discusión de la Validación de ese tipo de métodos sobrepasa los alcances de este libro.

En la FEUM, se establece una clasificación de los Métodos Analíticos para fines de Validación, en la que estos se dividen en cuatro categorías⁷:

- **Categoría I.** Aquellos que se emplean para **cuantificar a un componente específico** en muestras de producto terminado o en pruebas de

estabilidad, ya sea en fármacos, aditivos o preparados farmacéuticos, u otros analitos de interés (conservadores, solventes, etc.).

- **Categoría II.** Métodos Analíticos para la **determinación de impurezas** (productos de degradación, sustancias relacionadas, isómeros ópticos, etc.). Se puede considerar dentro de estos las determinaciones cuantitativas o las pruebas límite de impurezas. No se incluye en esta categoría a los métodos en los que se determina la pureza.
- **Categoría III.** Son aquellos con los que, mediante la determinación de un analito en una muestra, se **evalúa una característica de desempeño de un preparado farmacéutico** (liberación o disolución del activo a partir de una determinada formulación, por ejemplo).
- **Categoría IV.** Pruebas de identificación de un analito en muestras de fármacos, aditivos o preparados farmacéuticos, cuyo propósito es únicamente el de **establecer la presencia de dicho analito en la muestra**.

Por otra parte, en la Guía Q2 de la ICH², los Métodos Analíticos son clasificados de la siguiente manera:

1. **Ensayos de identidad**, que se utilizan, como su nombre lo indica, para asegurar la identidad de un analito en la muestra. Esto se logra normalmente comparando alguna propiedad del analito con la de un estándar.
2. **Pruebas para impurezas**, que pueden ser de tipo cuantitativo o cualitativo: Se busca con este tipo de métodos reflejar con Exactitud las características de pureza de la muestra.
3. **Métodos para valoración**, con los cuales se busca medir la cantidad de analito presente en una determinada muestra. Puede incluirse en esta categoría la determinación de la cantidad disuelta.

Independientemente de la fuente de clasificación de los métodos, resulta indispensable hacer notar que para comprobar la funcionalidad del Método Analítico (es decir, para su Validación), debemos conocer de inicio el objetivo del mismo, porque no se va a requerir demostrar las mismas propiedades para un método cuyo propósito es establecer si un analito está presente o no en la muestra, que para aquel método en donde es necesario conocer la cantidad del analito presente en el producto, o para aquel procedimiento en donde se buscará conocer el perfil de impurezas de un medicamento. Por lo anterior, dependiendo del objetivo del método de análisis, se elegirán las características de desempeño analítico a demostrar durante la Validación del mismo¹³⁻¹⁴.

Para iniciar con la explicación del proceso de selección (racional) de las características de desempeño analítico que deberán demostrarse durante la Validación de un método, y a manera de resumen, a continuación se enlistarán definiciones (propias) de aquellas que podrían ser evaluadas, en estricto orden alfabético.

Especificidad: Es la capacidad del Método Analítico para asegurar la presencia del analito en la muestra de manera inequívoca, aun cuando existan otros componentes (productos de degradación, intermedios de reacción, componentes de la matriz, entre otros) que se espera estén presentes en la muestra.

Exactitud: Es el grado de concordancia que existe entre los resultados obtenidos del análisis y el valor aceptado como real o de referencia. Se menciona que el término de Exactitud se refiere a la veracidad de la medición.

Intervalo: Se refiere al rango de concentraciones del Método Analítico (desde la más baja hasta la más alta), para el que se ha demostrado que los resultados analíticos presentan un nivel aceptable de Linealidad, precisión y Exactitud.

Límite de Cuantificación: Es la cantidad mínima del analito que puede ser determinada con Exactitud y precisión aceptables dentro de una muestra analítica, bajo las condiciones de aplicación del método.

Límite de Detección: Es la cantidad mínima del analito en una muestra que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, bajo las condiciones de aplicación del método.

Linealidad: Es la capacidad del sistema o método, para brindar resultados analíticos que son proporcionales a la concentración del analito en la muestra.

Precisión: Esta definición presenta un especial interés, porque existe una diferencia importante en su concepto entre la FEUM y la guía Q2 de ICH. De manera general, la precisión denota el grado de dispersión entre los resultados de la cuantificación del analito en múltiples muestreos de la misma muestra homogénea. Dicho de otra forma, es el grado en que los resultados del análisis múltiple de una muestra homogénea concuerdan entre sí. Ahora bien, en el caso de la FEUM, se definen dos niveles de precisión (repetibilidad y Reproducibilidad), y se maneja por separado un término denominado Tolerancia, mientras que para la guía Q2 se define tres niveles (repetibilidad, Precisión Intermedia y Reproducibilidad).

En el caso de la repetibilidad, la definición involucra el grado de dispersión que se obtiene de los resultados de la cuantificación del analito en múltiples muestreos de la misma muestra homogénea, cuando el análisis se realiza bajo las mismas condiciones analíticas (analista, día, equipo, tiempo), es decir, dentro de una misma "corrida" analítica.

En el caso de la Precisión Intermedia, se establece en la guía Q2 que es el grado de dispersión que se obtiene de los resultados de la cuantificación del analito en múltiples muestreos de la misma muestra homogénea, cuando el análisis se realiza variando algunas condiciones del método (analistas, días, equipos), dentro del mismo laboratorio. Esta definición, es equivalente a la que se establece en la FEUM bajo la denominación de Reproducibilidad; sin embargo, en la guía Q2, la Reproducibilidad se define en términos del grado de dispersión que se obtiene de los resultados de la cuantificación del analito en múltiples muestreos de la misma muestra homogénea, cuando se varían los laboratorios donde se realiza el análisis, es decir, en estudios de tipo colaborativo para el caso de una transferencia o verificación del método.

Robustez: Es la capacidad del Método Analítico de mantener su desempeño, en lo concerniente a los resultados que de éste se obtienen, al aplicar variaciones pequeñas, pero deliberadas, en las condiciones normales de operación del mismo (a manera de ejemplo, variaciones pequeñas de pH en las soluciones amortiguadoras, en las velocidades de flujo de la fase móvil, en las condiciones de almacenamiento de muestras, entre otras). Resulta sumamente relevante el mencionar que este término se confunde de manera común con el de Tolerancia.

Tolerancia: Es la habilidad para reproducir el Método Analítico en diferentes laboratorios o bajo circunstancias diferentes sin que ocurran diferencias inesperadas entre los resultados obtenidos.

Una vez que se han definido las diferentes características de desempeño que podrían determinarse durante la Validación de un Método Analítico, resulta importante definir un criterio para la selección de las mismas durante el proceso de planeación de la serie de experimentos o pruebas que serán conducidas para demostrar de manera inequívoca que el método sirve para el propósito con el que fue desarrollado. Empezaremos mencionando que, tanto en la FEUM como en la guía Q2, se establecen con claridad las características de desempeño analítico recomendadas para la Validación de un Método Analítico de acuerdo con su categoría. Para la FEUM, las características recomendadas para la Validación de un Método Analítico son las que en este trabajo se presentan en la Tabla 1.1. Cabe aclarar que estas características son virtualmente las mismas que se requieren para la USP^{8, 14}.

En la Tabla 1.2, se presentan las características de desempeño analítico recomendadas por la guía Q2 de la ICH para la Validación de un Método Analítico.

El análisis de las tablas 1.1 y 1.2 nos permite establecer una serie tanto de coincidencias como de puntos divergentes (no de fondo en estos últimos) entre la regulación establecida en la farmacopea y la guía internacional homologada. La primera convergencia es la relevancia de la determinación de Especificidad o selectividad del método, independientemente de su aplicación. La segunda, radica en la necesidad de asegurar, con una serie de determinaciones de características de desempeño, que los métodos en los que se involucra la cuantificación de algún analito permitirán hacerlo con un elevado grado de certeza en las determinaciones. La tercera y última convergencia visible, es la necesidad de contar con Métodos Analíticos confiables en todas las ocasiones en las que se lleve a cabo su utilización para la toma de decisiones.

De las principales divergencias que pueden observarse, resulta la más notoria que la FEUM incorpore la determinación de la verificación de los parámetros relacionados con el sistema analítico dentro del cuadro de características de desempeño, mientras que tanto en la USP como en la guía Q2 se sobreentiende que dichos parámetros ya han sido verificados de manera previa al inicio de la Validación del método. De cualquier manera, en los siguientes Capítulos se retomará de manera explícita la determinación de la verificación de parámetros de funcionamiento del sistema analítico. Otra divergencia, es el que la guía Q2 no haga explícita la determinación de los parámetros de Robustez y Tolerancia del método; en este caso, en la mencionada guía se explica que mucha de esta información se obtiene de manera natural durante la etapa de desarrollo del método mismo².

A manera de conclusión de este tema, **la selección de las características de desempeño analítico del método a validar, dependerá primordialmente del objetivo del método mismo**¹⁵⁻¹⁶. En los métodos de rutina, esta selección puede ya estar indicada en una guía o, como en el caso de México, en un documento normativo, como lo es la FEUM. El alcance de la determinación de cada parámetro, su análisis y conclusión con respecto al cumplimiento del mismo al aplicar el método, se analizarán de manera detallada en diferentes apartados de este libro.

Tabla 1.1 Características de desempeño analítico recomendadas para validar un método de acuerdo con la FEUM⁶.

Característica de desempeño	Categoría I	Categoría II Cuantitativas	Categoría II Cualitativas	Categoría III	Categoría IV
Verificación del Sistema	*	*	*	*	-
Precisión del Sistema	√	√	*	*	-
Linealidad del Sistema	√	√	*	*	-
Especificidad/Selectividad	√	√	√	*	√
Exactitud del Método	√	√	*	*	-
Linealidad del Método	√	√	*	*	-
Precisión del Método	√	√	-	√	-
Límite de Detección	-	-	√	*	-
Límite de Cuantificación	-	√	-	*	-
Tolerancia	*	*	*	*	*
Robustez	*	*	*	*	*

* Puede ser necesario dependiendo de la naturaleza del método.

- La determinación de dicha característica de desempeño no es recomendada.

Tabla 1.2 Características de desempeño analítico recomendadas para validar un método de acuerdo con la guía Q2 de ICH².

Característica de desempeño	Ensayos de Identidad	Pruebas para impurezas cuantitativas	Pruebas para impurezas cualitativas	Valoración
Especificidad/Selectividad	√	√	√	√
Exactitud del Método	-	√	-	√
Linealidad del Método	-	√	-	√
Intervalo	-	√	-	√
Precisión del Método				
Repetibilidad	-	√	-	√
Precisión Intermedia		√ (1)		√
Límite de Detección	-	- (2)	√	-
Límite de Cuantificación	-	√	-	-

1 Si se determina Reproducibilidad, no es necesario verificar Precisión Intermedia.

2 Puede requerirse en ocasiones.

- La determinación de dicha característica de desempeño no es recomendada.

1.4 Resumen del Capítulo 1

- Un Método Analítico es una serie de operaciones encaminadas a determinar la presencia, la cantidad (o ambas) de un analito en una muestra. Su finalidad será la de obtener un resultado, cuya interpretación servirá para la toma de decisiones con respecto a la calidad de un producto o proceso.
- La Validación de Métodos Analíticos puede definirse como la demostración, mediante la recopilación, análisis y evaluación objetiva de la evidencia obtenida a partir de pruebas específicas, de que un procedimiento o Método Analítico puede ser utilizado o aplicado en el análisis de un analito dentro de una determinada muestra.
- La Validación de Métodos Analíticos, junto con la calificación de equipos analíticos y las pruebas de Adecuabilidad del Sistema analítico, permite tener certeza técnica con respecto a los resultados obtenidos con un Método Analítico.
- Un procedimiento posterior al desarrollo de un Método Analítico será, de manera inequívoca, la Validación del mismo.
- Para validar un método, se requiere demostrar que este cumple con una determinada serie de características de desempeño analítico. La selección de las características de desempeño analítico a demostrar, dependerá primordialmente del objetivo del método mismo.

1.5 Bibliografía del Capítulo 1

1. Centro Nacional de Metrología. Métodos Analíticos adecuados a su propósito. Guía de laboratorio para la Validación de métodos y temas relacionados. Publicación técnica CNM-MRD-PT-030. 2ª edición. Los Cués, Querétaro, México: Centro Nacional de Metrología; 2005.
2. ICH Expert Working Group. Validation of analytical methods. Text and methodology Q2(R1) [Internet]. International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use; 2005 [citado 2016 Jun 28]. 13 p. Disponible en: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf.
3. European Commission. Final version of annex 15 to the EU guide to good manufacturing practice: qualification and validation. Brussels, Belgium: European Commission, Health and Consumers Directorate-General; 2014.
4. Real Academia Española de la Lengua. Diccionario de la lengua española [Internet]. Madrid, España: Real Academia Española de la Lengua; 2015 [citado 2016 jun 28]. Disponible en: www.rae.es
5. United States Food and Drug Administration. Current good manufacturing practices for finished pharmaceuticals. Code of Federal Regulations. Title 21. Chapter I [internet]. Washington. United States Government; 2016 [citado 2016 Jun 28]. Disponible en: <https://www.law.cornell.edu/cfr/text/21/820.3>
6. Secretaría de Salud. Norma Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-2013, Buenas prácticas de fabricación de medicamentos. Ciudad de México: Secretaría de Salud; 2013.
7. Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. 11ª edición. México D.F: Secretaría de Salud; 2015.
8. The United States Pharmacopeial Convention. The United States Pharmacopeia. 39th ed. Rockville, Maryland: The United States Pharmacopeial Convention Inc; 2015.
9. Nethercote P, Ermer J. Quality by Design for Analytical Methods: Implications for Method Validation and Transfer. Pharm Tech. 2012; 36(10):74-79.
10. McPolin O. Validation of analytical methods for pharmaceutical analysis. Warrenport, Northern Ireland, United Kingdom: Mourne training services; 2009.
11. Basal S, Layloff T, Bush E, Hamilton M, Hankinson E, Landy J, Lowes S, Nasr M, Saint Jean P, Shah V. Qualification of analytical instruments

for use in the pharmaceutical industry: a scientific approach. *AAPS Pharm Sci Tech.* 2004; 5(1):151-8.

12. Chauhan A, Mittu B, Chauhan P. Analytical method development and validation: a concise review. *J Anal Bioanal Tech.* 2015; 6(1):233-237.
13. Rozet E, Ceccato A, Hubert C, Ziemons E, Oprean R, Rudaz S, Boulanger B, Hubert H. Analysis of recent pharmaceutical regulatory documents on analytical method validation. *J Chromatography A.* 2007; 1158: 111-125.
14. González A, Herrador M. A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles. *Trends Anal Chem.* 2007; 26(3): 227-38.
15. Ermer J, Miller J. Method validation in pharmaceutical analysis, a guide to best practice. New York: Wiley; 2005.
16. Chan C, Lee Y, Lam H, Zhang X. Analytical method validation and instrument performance verification. New York: Wiley; 2004.

Capítulo 2

Cómo asegurar
la calidad de
los datos para
una Validación
de Métodos
Analíticos exitosa



Como se mencionó en el Capítulo 1, la Validación de Métodos Analíticos forma parte de los requerimientos básicos para asegurar la certeza técnica con respecto a los resultados que se obtendrán del mismo método una vez que este sea aplicado al análisis de muestras. Antes de proceder a la Validación del método, se requiere cumplir con dos requisitos que permitirán asegurar la calidad de los datos que se obtengan durante la comprobación de las características de desempeño analítico del método a validar, estos requisitos son:

- La calificación de equipos o instrumentos, y
- La demostración de la Adecuabilidad del Sistema analítico.

Ambos requisitos, serán desarrollados en este Capítulo de una manera sucinta, de tal manera que permitan al lector comprender su relevancia para la Validación del Método Analítico y, en Capítulos posteriores, la forma de planearlos y documentarlos en el contexto tanto del protocolo como del reporte de la Validación del Método Analítico.

2.1 Calificación de equipos o instrumentos

2.1.1 Conocimiento de la incertidumbre de las mediciones

Como ya se había establecido en el Capítulo anterior, un Método Analítico tiene como finalidad el obtener una medición, que es un **"conjunto de operaciones que tienen por objeto determinar un valor de una magnitud"**¹. Como tal, una medición nos señala una propiedad de algo, en el caso de los métodos de análisis, podría ser la concentración del analito en una muestra, o tal vez la determinación de la presencia y cantidad de una impureza en otra muestra, dando en cualquier caso una magnitud a la propiedad que se mide. En nuestro país, los **instrumentos** para medir se definen como **"los medios técnicos con los cuales se efectúan las mediciones y que comprenden las medidas materializadas y los aparatos medidores"**². Toda medición, se realiza utilizando un instrumento, con lo que se obtiene un resultado que consta de dos partes: un número y una unidad de medida³. Cabe aclarar, que una medición siempre es realizada en un instrumento y tiene que ser relacionada con una medida normalizada, por lo que la simple comparación de dos unidades del mismo producto, o el resultado de una prueba donde se tiene como respuesta el si un producto "pasa o no pasa" (es decir, una respuesta categórica),

no es una medición³⁻⁴. Aquellos equipos en los que no se cumplan las condiciones de ser utilizados para efectuar mediciones y de usar medidas normalizadas, se clasificarán, para fines de este trabajo, como equipos analíticos.

Toda medición que se realiza está sujeta a un determinado grado de incertidumbre, y esta medición solamente puede considerarse como válida si es que viene acompañada del conocimiento del grado de incertidumbre de la misma. En términos analíticos, la **incertidumbre de una medición** puede definirse como **“un parámetro asociado con el resultado de una medición, que caracteriza la dispersión de los valores que podrían ser razonablemente atribuidos al mensurando”**⁴⁻⁵. Esta definición es de gran relevancia ya que la palabra incertidumbre, en el léxico común, implica duda; **en el caso de los Métodos Analíticos**, por el contrario, **la incertidumbre de la medición no implica duda alguna con respecto a la validez de la medición; por el contrario, el conocimiento de la incertidumbre de la medición implica el incremento del grado de confianza de la validez del resultado analítico obtenido, toda vez que se refiere a la dispersión o variedad de valores del resultado analítico que son posibles de obtener (de manera razonable) en un proceso de medición determinado**. Si bien este libro no tiene la finalidad de abundar en el tema de la incertidumbre, y dicho tema podría estar desarrollado de mejor manera en algunas de las fuentes bibliográficas consultadas para el desarrollo de este Capítulo⁵⁻⁸, sí es importante mencionar, de manera muy general y breve, la lógica de la determinación de la incertidumbre.

- En la práctica, la incertidumbre de la medición puede provenir de diferentes fuentes, incluyendo la forma de muestreo, el almacenamiento de la muestra, los efectos de la matriz, las condiciones ambientales del método, las incertidumbres de equipos, materiales, sustancias de referencia, purezas de los reactivos, aproximaciones en los cálculos y, por supuesto, variaciones aleatorias de los resultados. Por ejemplo, en un método en el que se desea conocer el contenido de un fármaco en una muestra, se pesa una cantidad de la muestra, se disuelve en un disolvente apropiado, se toma una alícuota y se mide la absorbancia de la muestra en el espectrofotómetro UV o visible, comparando posteriormente con un estándar de pureza conocida, como se muestra en el diagrama de la figura 2.1.



Figura 2.1 Diagrama de un Método Analítico para determinar la pureza de un fármaco en una muestra.

El mensurando en este caso será la concentración de fármaco (C_f) en la muestra, obtenida a partir de la ecuación 2.1:

$$C_f = \frac{C_s \times A_s}{A_f} \times P_s$$

Ecuación 2.1

Donde:

C_f = Concentración del fármaco en la muestra.

C_s = Concentración del estándar.

A_s = Absorbancia del estándar.

A_f = Absorbancia de la solución de la muestra.

P_s = Pureza del estándar.

Algunas fuentes de incertidumbre para dicho método, podrían esquematizarse en un diagrama de Ishikawa, como el que se muestra en la Figura 2.2.

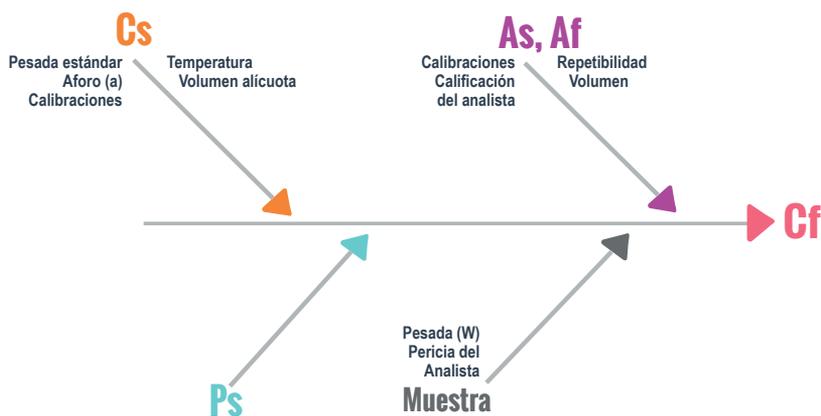


Figura 2.2 Posibles fuentes de incertidumbre para el método propuesto en el diagrama de la Figura 2.1.

- Se puede determinar la contribución a la incertidumbre de cada una de las fuentes (x_1, x_2, \dots, x_n) de manera separada. Cada una de esas contribuciones obtenidas por separado es un componente de la incertidumbre. Se pueden tener los valores de incertidumbre (u) de la pureza del estándar $u(P_s)$, de las pesadas $u(W)$, de los aforos $u(a)$, de las calibraciones $u(c)$, entre otras. A manera de ejemplo:
 - Si se deseara conocer la incertidumbre asociada a la pesada de la muestra, esta puede obtenerse a partir de la información que brinda su certificado de calibración y fuentes internas de incertidumbre de la balanza establecidas por el fabricante de la misma (resolución de la escala, Linealidad, repetibilidad y sensibilidad de la balanza). La calibración puede reportar una incertidumbre, a manera de ejemplo, de 0.01%.
 - Si se desea conocer la contribución a la incertidumbre por la pureza del estándar, se puede asumir a partir del certificado de análisis del proveedor, por ejemplo, si se menciona $99.99 \pm 0.01\%$, la pureza será 0.9999 ± 0.0001 .
- Una vez conocida la contribución de cada fuente (x_1, x_2, \dots, x_n), la incertidumbre total, denominada incertidumbre total combinada de la medición (y), que se denota como $u_c(y)$, es la raíz cuadrada positiva de la varianza total obtenida al combinar todos los componentes de la incertidumbre asociados. Esa desviación estándar, indica los valores que, de manera razonable, pueden tomar los resultados del análisis, si es que las fuentes de variación son independientes entre sí (ecuación 2.2):

$$u_c(y(x_1, x_2, \dots)) = \sqrt{\sum_{i=1}^n c_i^2 u(x_i)^2}$$

Ecuación 2.2

Donde $y(x_1, x_2, \dots)$ es una función de varios parámetros o fuentes de incertidumbre x_1, x_2, \dots , c_i es un coeficiente de sensibilidad dependiente de la ponderación de cada fuente de incertidumbre. Como puede observarse claramente, la incertidumbre total combinada es una desviación estándar, un parámetro que denota, como se mencionó en la definición, **la dispersión de los valores que podrían ser razonablemente atribuidos al mensurando**. El conocimiento de la incertidumbre de la medición, permite conocer entonces los valores que, de manera racional, pueden obtenerse como resultado de una medición, y permite tener certeza de la calidad de las mediciones.

Se recomienda al lector abundar en el conocimiento de este tema, partiendo tal vez de la revisión y análisis de la bibliografía utilizada en este texto⁵⁻⁸.

2.1.2 Error en las mediciones

Es importante distinguir entre los conceptos de incertidumbre y error. El **error** es la **diferencia entre un resultado individual de la medición y el valor real del mensurando**⁵⁻⁹. En la práctica, un error de medición es la diferencia entre el valor obtenido y el valor de referencia; es decir, el error es un valor único y, en principio, si se conoce la magnitud del error, esta podría aplicarse como una corrección del resultado. Por otro lado, la incertidumbre es un intervalo de valores obtenido a partir de una serie de determinaciones de una misma muestra aplicando un mismo procedimiento analítico, que representan todas las posibles magnitudes que ha de tomar la respuesta analítica obtenida para las muestras aplicando el método de medición. De manera general, el valor de la incertidumbre no puede ser utilizado para corregir el valor de una medición.

Se puede mencionar, de manera general, que el error consta de dos componentes, un componente aleatorio y otro sistemático.

El error aleatorio, proviene comúnmente de variaciones impredecibles en las magnitudes que se están determinando, que se traducen en variaciones en las observaciones repetidas del mensurando. Este tipo de error no puede ser compensado de forma alguna, pero **puede reducirse conforme se tiene un número mayor de observaciones**^{1,6}.

El error sistemático, por otra parte, se define como un componente del error el cual, en el transcurso de una serie de mediciones del mismo analito, permanece constante (por ejemplo, la falta de corrección contra un blanco para una medición) o varía de una forma predecible (por ejemplo, el cambio en el valor de tiempo de retención en un cromatograma en función de la variación de la temperatura en un laboratorio). El error **sistemático es independiente del número de mediciones y no es posible, por lo tanto, reducirlo incrementando el número de análisis realizados a la muestra.** Es importante mencionar, que el resultado de una medición debe ser corregido para todos aquellos efectos sistemáticos significativos, lo cual se realiza, para los instrumentos de medición, ajustándolos o calibrándolos de acuerdo con materiales de referencia estandarizados¹⁰.

Para ejemplificar ambos tipos de errores, supongamos que un grupo de cuatro alumnos llevó a cabo el análisis del contenido de indometacina en tabletas. Los resultados obtenidos por cada alumno después del análisis espectrofotométrico repetido (5 veces) de muestras extraídas de las tabletas y su transformación a porcentajes de indometacina se enumeran en la Tabla 2.1. Por tratarse de un ejemplo, existen los siguientes supuestos:

- Las tabletas contienen 20 mg del principio activo cada una (lo que corresponde al 100%).
- Todas y cada una de las tabletas contienen en realidad 20 mg, y ese es el único valor que es posible obtener como resultado del análisis..

Tabla 2.1 Resultados analíticos obtenidos por cada alumnos en el análisis de indometacina en tabletas.

Alumno	Resultado 1	Resultado 2	Resultado 3	Resultado 4	Resultado 5	Promedio
1	99.6	99.9	100.1	100.4	100.0	100.00
2	99.8	96.2	96.3	103.1	105.4	100.16
3	94.6	95.4	95.2	94.8	95.0	95.00
4	102.2	91.1	95.6	97.2	92.1	95.64

En la Figura 2.3, se muestra un diagrama de dispersión de los resultados obtenidos.

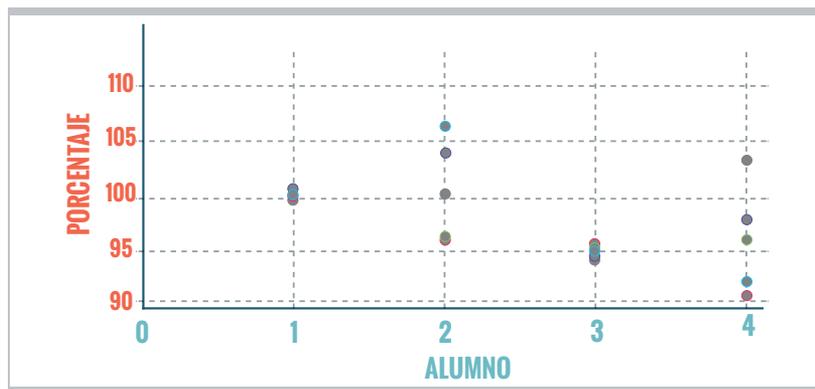


Figura 2.3 Diagrama de dispersión de los resultados obtenidos de análisis de indometacina en tabletas.

Como puede observarse en los resultados, entre el alumno 1 y el alumno 2 existe una diferencia importante en la dispersión de los resultados, ya que los obtenidos por el alumno 1 presentan baja dispersión, y los del alumno 2, aunque el promedio de sus resultados ronde el 100%, presentan una variación importante en las magnitudes medidas, es decir, los resultados de las mediciones obtenidas por el alumno 2 presentan un error aleatorio importante. Por otra parte, si se comparan los resultados obtenidos por el alumno 3 con los del alumno 4, se observa algo muy similar, ya que hay una gran dispersión en los resultados del alumno 4, por lo que el error aleatorio de los mismos es mayor. Finalmente, al comparar entre los resultados del alumno 1 con los del alumno 3, puede observarse que los del alumno 1 son más cercanos al valor real (100%), mientras los del alumno 3 son consistentemente bajos (con un promedio de 95%), por lo que el error sistemático está presente en los resultados obtenidos por el alumno 3, no así en los del alumno 1.

Para finalizar este tema, es preciso referirse a que, en muchos textos, se menciona un tercer tipo de error, al cual se le denomina como **error espurio** o error grosero. Este error es fácil de reconocer, porque es **aquel que proviene de forma directa de una reconocida falla humana** (mal trasvase de una alícuota, tirar una muestra, un mal aforo o transponer dígitos en la anotación de una pesada) **o de un mal funcionamiento de**

equipo (fugas en las tuberías de un equipo de cromatografía de líquidos, aire atrapado en una celda de flujo continuo para detección UV, mal uso de un instrumento). Una vez que se detecta este tipo de error, resulta muy claro que los resultados obtenidos son inválidos, y que debe repetirse el análisis, porque no hay forma de compensar o corregir los resultados que fueron obtenidos de una forma incorrecta^{1, 10-11}.

2.1.3 Elementos de la calificación de equipos e instrumentos analíticos

Los laboratorios de análisis farmacéutico cuentan con una gran cantidad de equipos e instrumentos, que son utilizados de manera individual o, comúnmente, de manera conjunta, para llevar a cabo los procesos que conforman un Método Analítico. La Validación de un Método Analítico únicamente puede ser demostrada a través de la aplicación de pruebas experimentales de desempeño del método. Para que estas pruebas tengan confiabilidad, sus resultados deben provenir de equipos e instrumentos que permitan tener una certeza adecuada de su funcionamiento, brindando datos analíticos de calidad.

La **calificación de los equipos e instrumentos analíticos es la evidencia documentada de que dicho equipo o instrumento se desempeña de manera adecuada para su propósito determinado, y de que se mantiene y calibra (si fuera el caso) también de forma adecuada**. La calificación de los instrumentos y equipos analíticos se lleva a cabo, de manera tradicional, en cuatro etapas, a saber⁹⁻¹⁵:

- **Calificación de Diseño:** Incluye todos los procedimientos previos a la instalación del equipo o instrumento. En ella se definen las especificaciones operacionales y funcionales del equipo o instrumento aunque, en la realidad, con los aparatos comercialmente disponibles poco hay que establecer en esta etapa de la calificación.
- **Calificación de la Instalación:** Incluye los procedimientos relacionados con la instalación del instrumento o equipo en un ambiente seleccionado. Se asegura en esta etapa que dicho ambiente de trabajo es el adecuado para la correcta operación del aparato.
- **Calificación de la Operación:** En esta etapa se demuestra que el instrumento o equipo funcionará de acuerdo con sus especificaciones operacionales en el ambiente seleccionado. La calificación de operación se lleva a cabo después de la instalación de un nuevo instrumento o equipo o de la reparación o cambio de localización de un instrumento ya existente.

- **Calificación del desempeño:** Se define como el proceso mediante el cual se demuestra que el instrumento o equipo funciona consistentemente de acuerdo con las especificaciones establecidas para su uso rutinario. En esta etapa, es cuando se lleva a cabo la **calibración** del equipo, si es que este sirve para realizar una medición (es decir, **si se trata de un instrumento**), dicha **calibración** tiene la **"finalidad de procurar la uniformidad y confiabilidad de las mediciones que se realizan..."**, ya que la **calibración** es el **"conjunto de operaciones que tiene por finalidad determinar los errores de un instrumento para medir y, de ser necesario, otras características metrológicas"**¹. La idea es, entonces, demostrar la trazabilidad de las mediciones, la cual, de acuerdo con la Guía 30 de la ISO, es **"la propiedad del resultado de una medición o del valor de un patrón por medio de la cual éstos pueden ser relacionados, con una incertidumbre determinada, a referencias establecidas, generalmente patrones nacionales o internacionales, a través de una cadena ininterrumpida de comparaciones"**¹. Dicho de otra forma, los instrumentos se calibran porque resulta indispensable el conocer si las mediciones obtenidas a partir de ellos son comparables (trazables) con respecto a patrones de medida internacionalmente aceptados.

Para complementar la información, se presenta en la Tabla 2.2 una propuesta para clasificar los equipos e instrumentos, donde se catalogan de acuerdo con la complejidad en los procedimientos de aseguramiento de la calidad para demostrar su calificación.

Una vez que se ha establecido una adecuada calificación (y, reiterando, en el caso de los instrumentos, calibración) de los equipos, es necesario demostrar la aplicabilidad del proceso de análisis en las condiciones experimentales que conforman el procedimiento analítico, a través de la demostración de la Adecuabilidad del Sistema.

2.2 Adecuabilidad del Sistema Analítico

Como ya se mencionó al inicio de este Capítulo, la determinación de la Adecuabilidad del Sistema es un requisito indispensable para asegurar la calidad de los datos obtenidos de una medición. De hecho, **la determinación de la Adecuabilidad del Sistema, es considerada una parte integral del Método Analítico**, bajo el principio de que el equipo, los sistemas electrónicos, las operaciones analíticas y las muestras a analizar constituyen un sistema integral, y como tal, deben evaluarse¹⁶.

Tabla 2.2 Clasificación de los equipos de laboratorio de acuerdo con la complejidad en los procesos para calificarlos.

Categoría	Procesos requeridos para calificar los equipos	Ejemplos
A	<ul style="list-style-type: none"> No hay un protocolo especial Se determina por la inspección visual del equipo 	<ul style="list-style-type: none"> Microscopios ópticos, Agitadores magnéticos, Mezcladores vortex, entre otros
B	<ul style="list-style-type: none"> Se establecen Procedimientos Normalizados de Operación para su calificación No hay ambigüedad en los parámetros para calificarlos 	<ul style="list-style-type: none"> Balanzas, Incubadoras, Pipetas automáticas, Refractómetros
C	<ul style="list-style-type: none"> Se establecen Procedimientos Normalizados de Operación para su calificación, considerando que su uso es altamente específico para determinadas aplicaciones Su instalación normalmente requiere la asistencia de un experto altamente calificado No hay ambigüedad en los parámetros para calificarlos Su calificación, en muchas ocasiones, abarca las cuatro etapas mencionadas en el texto. 	<ul style="list-style-type: none"> Espectrofotómetros de absorción atómica Calorímetros de barrido diferencial Densitómetros Cromatógrafos Espectrómetros Espectrofotómetros (masas, Infrarrojo cercano, Raman) Espectrofotómetros (UV/visible, arreglo de diodos) Lectores de microplacas Analizadores elementales

Podemos partir para establecer una definición de **Adecuabilidad del Sistema**, de aquella referida en la FEUM, en su onceava edición, como **verificación del sistema**, donde se menciona que "*son pruebas utilizadas para verificar que el sistema funciona correctamente, con base en los criterios establecidos previamente*"⁷, se menciona en este documento que también se le conoce como buen o correcto funcionamiento del sistema. Esta definición no es tan clara como sería deseable, por lo que una más sencilla de entender es aquella donde se establece que la **Adecuabilidad del Sistema se refiere a las pruebas diseñadas para evaluar al sistema analítico, con la finalidad de demostrar que el desempeño de dicho sistema cumple con los estándares para utilizarse en el Método Analítico, es decir, para conocer si el sistema funciona apropiadamente para llevar a cabo mediciones confiables con el mismo**¹⁰.

Como se mencionó anteriormente, la determinación de la Adecuabilidad del Sistema requiere la aplicación de una serie de pruebas diversas, cuya selección dependerá, en un principio, de la naturaleza y complejidad del sistema a utilizar. Por ejemplo, no se tendrá que considerar el mismo tipo de pruebas para un Método Analítico que permita cuantificar a un principio activo cuando en dicho método se emplea como técnica analítica la Espectrofotometría Ultravioleta, que cuando se utiliza como técnica la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR), toda vez que estaremos enfrentando dos tipos de sistemas diferentes, que requieren la demostración de su buen funcionamiento con indicadores también diferentes.

Una forma muy adecuada de establecer las características del sistema analítico a probar durante la demostración de la adecuabilidad del mismo, consiste en recurrir principalmente a las descripciones de los métodos generales de análisis en las diferentes farmacopeas, donde se detallan de una manera confiable los parámetros de instalación, operación y desempeño de los diversos equipos e instrumentos utilizados en las técnicas analíticas: Continuando con el ejemplo mencionado en este mismo párrafo, para el método donde se utiliza un espectrofotómetro Ultravioleta (UV) como instrumento de medición, muy probablemente sea adecuado demostrar que las lecturas obtenidas de una misma solución en el instrumento no presentan una variabilidad considerable, mientras que para la aplicación de un método donde se utiliza como técnica la CLAR con detección UV, se requerirá determinar no solamente que existe baja variabilidad entre inyecciones de la misma muestra, sino también el comprobar que los tiempos de retención de los analitos no se modifican sustancialmente entre inyecciones, asegurando conjuntamente la magnitud del coleo de los picos, la selectividad entre los mismos, además de muchos otros parámetros, que claramente están

especificados en los Capítulos de las farmacopeas donde se explica la técnica de CLAR.

Ahora bien, a pesar de lo mencionado en el párrafo anterior, resulta común que, en diversas fuentes bibliográficas donde se establecen requisitos o procedimientos para validar Métodos Analíticos^{11, 16-18}, se proponga el desarrollo de dos pruebas que resultan relativamente uniformes y de amplia aplicabilidad para demostrar la Adecuabilidad del Sistema. Estas pruebas son la **Precisión del Sistema** y la **Linealidad del Sistema**.

La **Precisión del Sistema es el grado de concordancia relativa de la respuesta analítica de soluciones de referencia de magnitud o concentración conocida**¹⁷. Esta prueba consiste, de manera general, en preparar por lo menos seis soluciones que representen la respuesta al 100% de su magnitud (cantidad o concentración del analito en la muestra), a partir de una sustancia de referencia, ya sea por pesadas independientes o por dilución, y medir su respuesta dentro de una misma corrida analítica. Es claro, a partir de la descripción de esta prueba, que lo que se busca es verificar que la variabilidad inherente a la respuesta analítica por el uso de equipos, instrumentos de medición, el procedimiento de análisis, el mismo analista, dentro de muchos otros factores, no sobrepase un valor establecido *a priori*, de tal forma que el sistema no contribuya por sí mismo de manera significativa a las variaciones aleatorias en los resultados del análisis. El resultado comúnmente expresado para conocer la Precisión del Sistema, es el coeficiente de variación (Ecuación 2.3) de la respuesta analítica, mismo que deberá cumplir con un criterio determinado establecido de antemano, como ya se mencionó¹⁹.

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

Ecuación 2.3

Donde:

CV = Coeficiente de Variación.

S_y = Desviación estándar de las observaciones.

\bar{y} = Promedio de las observaciones.

Por ejemplo, si para la determinación de Precisión del Sistema se cuenta con los resultados mostrados en la Tabla 2.3, bastará calcular el coeficiente de variación respectivo (que en este caso es de 0.853%), y determinar si es mayor o no al valor preestablecido (que, para fines del ejemplo, sería de 1.0%). En este ejemplo, dado el valor de CV calculado, el sistema analítico es preciso.

Tabla 2.3 Ejemplo de la determinación de Precisión del Sistema para un método analítico por CLAR.

Número de Inyección	Área bajo la curva del pico del analito (mUA)
1	105678
2	106789
3	105344
4	106154
5	104158
6	106111

$$CV = \frac{S_y}{\bar{y}} \times 100 = \frac{901.7482}{105705.667} \times 100 = 0.853\%$$

La segunda prueba general, denominada **Linealidad del Sistema**, **consiste en la verificación de que la respuesta analítica y la concentración del analito (mismo que, normalmente, es la sustancia de referencia en el desarrollo de esta prueba) se ajustan a un modelo matemático (comúnmente el modelo lineal), en un intervalo de concentraciones pertinentes a la aplicación analítica**⁴⁷. La prueba se realiza construyendo una curva concentración vs respuesta a partir de cinco diluciones (niveles de concentración) del analito preparados por triplicado, en el intervalo de concentraciones esperado durante la aplicación del método en muestras reales. Una vez que se cuenta con los datos, se debe construir la curva y estimar los parámetros adecuados del modelo con base en métodos estadísticos (mínimos cuadrados, máxima verosimilitud, entre otros), acompañando esta estimación de criterios para definir la calidad de ajuste al modelo (efecto del modelo, magnitud del coeficiente de determinación, o prueba estadística de falta de ajuste). Es importante señalar, que el manejo de datos para el ajuste a un modelo matemático por el método de mínimos cuadrados en la determinación de Linealidad, se abordará con detalle en el siguiente Capítulo de este libro (sección 3.2.4), por lo que se obviará aquí una descripción mayor de los cálculos involucrados en este proceso.

Para finalizar este Capítulo, la calidad de los datos que han de obtenerse durante las pruebas encaminadas a demostrar la Validación del Método Analítico, dependerá en gran medida de una correcta calificación de equipos y de la determinación de que el sistema funciona de manera correcta.

2.3 Resumen del Capítulo 2

- Antes de proceder a la Validación del Método, se requiere cumplir con dos requisitos que permitirán asegurar la calidad de los datos que se obtengan durante la comprobación de las características de desempeño analítico del método a validar, estos requisitos son: la calificación de equipos o instrumentos, y la demostración de la Adecuabilidad del Sistema analítico.
- Las mediciones se llevan a cabo utilizando instrumentos que se definen como los medios técnicos con los cuales se efectúan las mediciones y que comprenden las medidas materializadas y los aparatos medidores.
- Las mediciones se definen en su magnitud por su incertidumbre, la cual es un parámetro que caracteriza la dispersión de los valores que podrían ser razonablemente atribuidos al mensurado.
- No debe confundirse el término de incertidumbre con el de error. El error es la diferencia entre un resultado individual de la medición y el valor real del mensurado.
- El error tiene dos componentes principales, el sistemático, que se define como aquel que, en el transcurso de una serie de mediciones del mismo analito, permanece constante (por ejemplo, la falta de corrección contra un blanco para una medición) o varía de una forma predecible (por ejemplo, el cambio en el valor de tiempo de retención en un cromatograma en función de la variación de la temperatura en un laboratorio). El componente aleatorio, por otra parte, proviene comúnmente de variaciones impredecibles en las magnitudes que se están determinando,

- La calificación de los equipos e instrumentos analíticos es la evidencia documentada de que dicho equipo o instrumento se desempeña de manera adecuada para su propósito determinado, y de que se mantiene y calibra (si fuera el caso) también de forma adecuada.
- La calificación se establece en cuatro tiempos y niveles: de diseño, de instalación, de operación y de desempeño.
- La calibración es el conjunto de operaciones que tiene por finalidad determinar los errores de un instrumento para medir y, de ser necesario, otras características metrológicas.
- La calibración permite demostrar la trazabilidad de las mediciones, que es la propiedad del resultado de una medición o del valor de un patrón por medio de la cual éstos pueden ser relacionados, con una incertidumbre determinada, a referencias establecidas, generalmente patrones nacionales o internacionales, a través de una cadena ininterrumpida de comparaciones
- La Adecuabilidad del Sistema se refiere a las pruebas diseñadas para evaluar al sistema analítico, con la finalidad de demostrar que el desempeño de dicho sistema cumple con los estándares para utilizarse en el método analítico, es decir, para conocer si el sistema funciona apropiadamente para llevar a cabo mediciones confiables con el mismo.
- La demostración de la Adecuabilidad del Sistema requiere de una serie de pruebas diversas, cuya selección dependerá, en un principio, de la naturaleza y complejidad del sistema a utilizar.

- Resulta común que, en diversas fuentes bibliográficas donde se establecen requisitos o procedimientos para validar Métodos Analíticos, se proponga el desarrollo de dos pruebas que resultan relativamente uniformes para demostrar la Adecuabilidad del Sistema: la precisión y la Linealidad del Sistema.
- La Precisión del Sistema es el grado de concordancia relativa de la respuesta analítica de soluciones de referencia de magnitud o concentración conocida.
- La Linealidad del Sistema, consiste en la verificación de que la respuesta analítica y la concentración del analito se ajustan a un modelo matemático, en un intervalo de concentraciones pertinentes a la aplicación analítica

2.4 Bibliografía del Capítulo 2

1. Centro Nacional de Metrología. Métodos Analíticos adecuados a su propósito. Guía de laboratorio para la Validación de métodos y temas relacionados. Publicación técnica CNM-MRD-PT-030. 2ª edición. Los Cués, Querétaro, México: Centro Nacional de Metrología; 2005.
2. Cámara de Diputados del H. Congreso de la Unión. Ley federal sobre metrología y normalización. Ciudad de México: Diario Oficial de la Federación; 2015.
3. Bell S. A Beginner's Guide to Uncertainty of Measurement. Measurement Good Practice Guide No. 11 (Issue 2). Teddington, Middlesex, United Kingdom: Centre for Basic, Thermal and Length Metrology, National Physical Laboratory; 2001.
4. BIPM, IEC, IFCC, ILAC, IUPAC, IUPAP, ISO, OIML. International vocabulary of metrology—Basic and general concepts and associated terms (VIM). 3rd edn. Pavillon de Breteuille, Sévres, France: Bureau International des Poids et Mesures; 2008.
5. Ellison S, Williams A. Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement. EURACHEM/CITAC Guide Number 4. 3rd edition. Teddington, United Kingdom: Eurachem/CITAC; 2012.
6. González A, Herrador M. A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles. *Trends Anal Chem.* 2007; 26(3): 227-38.
7. Weitzel M. The estimation and use of measurement uncertainty for a drug substance test procedure validated according to <USP 1225>. *Accred Qual Assur* 2012; 17:139-146.
8. Hauck WW, Koch W, Abernethy D, Williams RL. Making sense of trueness, precision, accuracy, and uncertainty. *Pharmacoepial Forum.* 2008 May;34(3):838-842.
9. Ermer J, Miller J. Method validation in pharmaceutical analysis, a guide to best practice. New York: Wiley; 2005.
10. Watson D, Edrada-Ebel R. Pharmaceutical analysis. A textbook for Pharmacy students and pharmaceutical chemists. 3rd edition. Edinburgh, Ireland: Churchill Livingstone Elsevier; 2012.
11. McPolin O. Validation of analytical methods for pharmaceutical analysis. Warrenport, Northern Ireland, United Kingdom: Mourne training services; 2009.
12. ICH Expert Working Group. Good manufacturing practices for pharmaceutical ingredients Q7 [Internet]. International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use; 2000 [citado 2016 Jun 28]. 13 p.

- Disponible en: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q7/Step4/Q7_Guideline.pdf.
13. Basal S, Layloff T, Bush E, Hamilton M, Hankinson E, Landy J, Lowes S, Nasr M, Saint Jean P, Shah V. Qualification of analytical instruments for use in the pharmaceutical industry: a scientific approach. *AAPS Pharm Sci Tech*. 2004; 5(1):151-8.
 14. U.S. Department of Health and Human Services. Center for Drug Evaluation and Research. Center for Biologics Evaluation and Research. Guidance for Industry: Analytical procedures and methods validation for drugs and biologics. Silver Spring, Maryland, USA; CDER; 2015.
 15. Chan C, Lee Y, Lam H, Zhang X. Analytical method validation and instrument performance verification. New York: Wiley; 2004.
 16. ICH Expert Working Group. Validation of analytical methods. Text and methodology Q2(R1) [Internet]. International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use; 2005 [citado 2016 Jun 28]. 13 p. Disponible en: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf.
 17. Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. 11a edición. México D.F: Secretaría de Salud; 2015.
 18. Comisión de Validación de Métodos Analíticos. Métodos Analíticos. Guía de Validación. Ciudad de México: Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México; 2002.
 19. Nethercote P, Ermer J. Quality by Design for Analytical Methods: Implications for Method Validation and Transfer. *Pharm Tech*. 2012; 36(10):74-79.

Capítulo 3

Características
de desempeño
analítico
demostrables
durante la
Validación del
Método



Una vez que se han establecido definiciones con respecto a la terminología general utilizada en la Validación de Métodos Analíticos, así como una serie de precisiones necesarias antes del inicio de los procesos necesarios que permitan demostrar que el método de análisis cumple con el propósito para el que fue creado, se procederá en este tercer Capítulo a abundar con respecto a las características de desempeño analítico que pueden ser demostradas (dependiendo de la naturaleza del mismo método) durante su Validación, mismas que ya se han definido en el Capítulo 1 de esta obra.

En todos los casos, se establecerá una definición de la característica a demostrar, una explicación de la necesidad de dicha demostración, la forma en que puede llevarse a cabo, la lógica en el cálculo (si se requiere) para llegar a un resultado, y la interpretación de dicho resultado.

2.1 Especificidad del método analítico

2.1.1 ¿Qué es la Especificidad de un Método Analítico?

De manera general los métodos de análisis, desde nuestra perspectiva, involucran cuatro grandes etapas durante su realización. Dichas etapas son:

- 1) Pesada de la muestra que contiene al analito.
- 2) Proceso de separación del analito a partir de la muestra.
- 3) Proceso de medición del analito.
- 4) Reporte del resultado de la medición del analito en la muestra.

Es deseable, independientemente de que el proceso de separación del analito de los demás componentes de la muestra exista y de que, en caso de existir, tenga o no un grado de complejidad elevado, que la respuesta analítica obtenida durante el proceso de medición sea derivada únicamente del analito de interés y que no se vea influida (de manera positiva o negativa) por otras sustancias presentes en la muestra. En este sentido, es que una característica de desempeño indispensable en el proceso de Validación de cualquier Método Analítico (y, a nuestro juicio, la primera que debe de demostrarse siempre) es la determinación de su Especificidad. En el Capítulo 1, se definió a la **Especificidad** como la **capacidad del Método Analítico para asegurar la presencia del**

analito en la muestra de manera inequívoca, aun cuando existan otros componentes (productos de degradación, intermedios de reacción, componentes de la matriz, entre otros) **que pudieran estar presentes en la muestra** (los cuales, potencialmente, pudieran interferir con su análisis). Esta definición, es compatible con las establecidas en diferentes referencias⁴⁻⁵, aunque presenta una particularidad, ya que en el contexto de la Validación de Métodos Analíticos en áreas diferentes a las Ciencias Farmacéuticas, el término Especificidad tiende a ser sustituido por el concepto de **selectividad**, cuya definición puede aproximarse al **grado en que la respuesta de un método de análisis proviene únicamente del analito de interés**³⁻⁵. Como puede observarse, **de la definición de selectividad desaparece el término "de manera inequívoca", y se habla de una gradualidad en la magnitud del resultado con respecto a la magnitud real del mensurando en la muestra**; dicho de otra forma, la Especificidad estaría relacionada con una selectividad "total" misma que, siendo realistas, sería muy difícil en la práctica de asegurar.

Es importante hacer notar, que en la FEUM⁶ se brindan ambas definiciones, y se menciona la determinación de Especificidad y selectividad como si fueran parámetros separados, estableciendo su diferencia con base en que la selectividad estaría derivada de si la medición del analito pudiera presentar en sus resultados influencias derivadas de condiciones ambientales (productos de degradación, intermedios de reacción, o artefactos en la muestra) , mientras que para el término Especificidad no se esclarece una definición. Para evitar confusiones, en este texto se mantendrá el término más común reportado en la literatura relacionada con el análisis farmacéutico, sin dejar de lado en algunos aspectos la gradualidad del resultado analítico que sería mejor establecida ocupando el término de selectividad.

3.1.2 ¿Por qué demostrar la Especificidad de un Método Analítico?

Todo método de análisis, independientemente del proceso mediante el cual se llegue a la determinación de la presencia, de la concentración, o de ambas para el analito en la muestra, es susceptible de verse afectado en sus resultados. Existen técnicas de análisis que no son específicas para un analito en particular, (como, por ejemplo, la volumetría en cualquiera de sus variantes), así como se tiene muestras en las que, aunque parezca que analito se encuentra en estado "puro", no es posible asegurar que las condiciones ambientales no modifiquen el grado de "pureza" del analito durante la vida útil de la muestra. Para que una medición estuviera en realidad libre de toda posible interferencia derivada de componentes

presentes en la muestra, deberían cumplirse como condiciones el que la técnica de medición determinara única y exclusivamente a esa sustancia de interés en las condiciones del análisis, y que el resultado del proceso de separación del analito a partir de la muestra (purificación previa a la medición) diera como resultado una solución del analito en estado puro; como puede suponerse, ambas condiciones son prácticamente imposibles de cumplir. Por lo anterior, es que debe de llevarse a cabo una investigación con respecto a la forma y el grado en que el método permite discriminar la respuesta obtenida a partir del compuesto de interés de aquella(s) que procedan de otra(s) fuente(s) diferente(s) presente(s) en la muestra (o, si nos apegamos un poco a lo establecido en la FEUM, aún de aquellas derivadas del tratamiento de la misma para llegar a la medición).

3.1.3 ¿Para qué tipo de métodos es necesario demostrar la Especificidad?

Como podrá esperarse, **no existe un tipo de método (cuali o cuantitativo) para el que no se deba demostrar la Especificidad**. La ubicuidad de este parámetro en las guías de Validación de Métodos Analíticos, se explica por sí sola, toda vez que siempre es indispensable asegurar que la respuesta analítica se debe al compuesto de interés (y de ser posible, asegurar que se debe únicamente al compuesto de interés).

Para los autores de este texto, resulta importante reiterar la recomendación de que la determinación de Especificidad sea la primera durante la Validación de un método de análisis, toda vez que si esto no es posible de asegurar, no existe certeza con respecto a la demostración de otras características de desempeño derivadas de un proceso de Validación del método de análisis.

3.1.3 ¿Cómo se determina la Especificidad de un Método Analítico?

Salvo en la FEUM, donde no se establece de manera precisa la forma de determinar la Especificidad, en diferentes fuentes de información se mencionan, de manera amplia, diversos requerimientos a cubrir para demostrar la Especificidad. Estos requerimientos se aplican comúnmente en función del tipo de método a validar. Con la finalidad de hacer más clara su explicación, se ordenarán en este texto también de esa forma.

3.1.4.1 Demostración de Especificidad para ensayos de identidad

Un ensayo de identidad será útil para su propósito en la medida en que permita discernir entre compuestos que pudieran estar presentes en la muestra y que presenten una similitud estructural importante con respecto al analito de interés. De manera común, se utilizan técnicas tales como la Espectrofotometría de Infrarrojo (IR), la Calorimetría de Barrido Diferencial (CDB), la Difracción de Rayos X (DRX), la Espectrofotometría Ultravioleta (UV) y los tiempos de retención obtenidos en la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) como ensayos de identidad, sin descartar a muchos otros⁷. En ese orden de ideas, **la habilidad de discriminación del método se podrá demostrar cuando:**

- a) **Se obtengan resultados positivos a partir de muestras que contienen al analito** como, por ejemplo:
 - i. En el ensayo de identidad "espectro de Infrarrojo", se obtendrá el espectro correspondiente a la sustancia de referencia, y otro para una muestra real, y ambos serán superponibles (Figura 3.1, A y B⁸).
 - ii. En CLAR, se obtenga el mismo tiempo de retención para el analito que para la sustancia de referencia (Figura 3.2 A y B).

- b) **Se obtengan resultados negativos para muestras que no contienen al analito**, por ejemplo:
 - i. Cuando en el ensayo de identidad no se obtenga un espectro de Infrarrojo al llevar a cabo el análisis de una muestra que no contenga al analito; como prueba adicional, puede obtenerse el espectro de Infrarrojo de sustancias estructuralmente relacionadas con el analito, que pudieran estar presentes en la muestra, y no se obtendría una señal superponible con aquella de la sustancia de referencia del analito de interés (Figura 3.1, D). En este último caso, la selección de las sustancias estructuralmente relacionadas se llevará a cabo dependiendo, sobre todo, de la experiencia de quien está llevando a cabo la Validación, y del fundamento razonable de utilizar dicha sustancia.

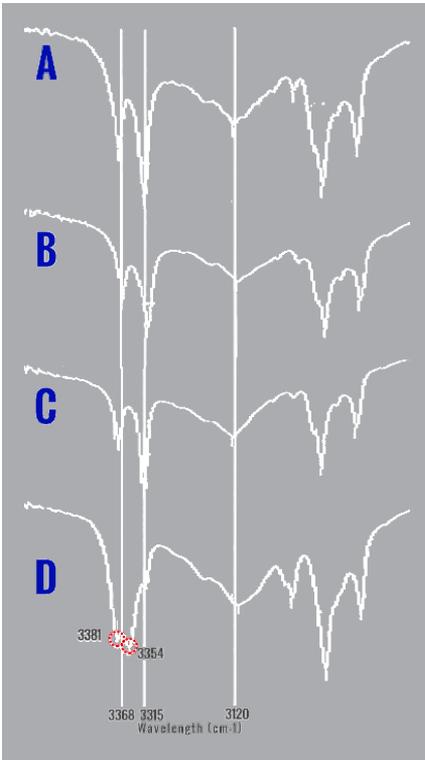


Figura 3.1 Región de los espectros de Infrarrojo de la sustancia de referencia glibenclamida (A), dos muestras que la contienen (B y C) y su producto de degradación (D)⁸.

- ii. Cuando en CLAR no haya señal visible al inyectar un extracto de la matriz de la muestra. Adicionalmente, cuando se obtengan tiempos de retención diferentes para el análisis cromatográfico de muestras a las que se hayan adicionado sustancias que presenten similitud estructural con el analito de interés (por ejemplo, lo mostrado en la Figura 3.2 D⁹).

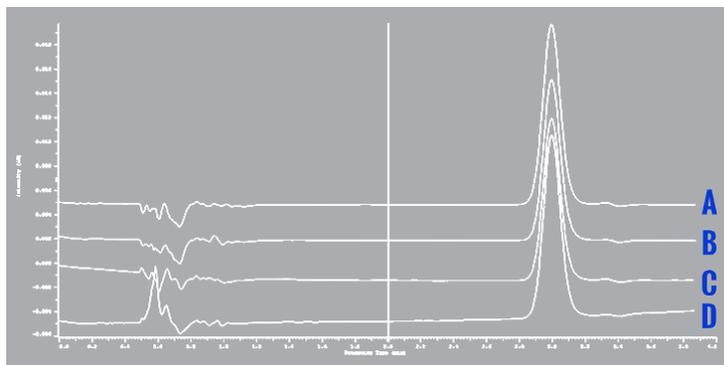


Figura 3.2 Cromatogramas de sustancia de referencia glibenclamida (A), muestra de glibenclamida (B), glibenclamida sometida a luz blanca (C) y glibenclamida sometida a pirólisis a 200 °C (D)⁹.

3.1.4.2 Demostración de Especificidad para pruebas de impurezas

Tanto las materias primas como los medicamentos pueden contener una gran cantidad de impurezas de diferentes tipos, dentro de los que es común encontrar intermedios de reacción, reactivos de síntesis, productos de degradación, catalizadores, metales residuales, adyuvantes de filtración, disolventes, impurezas enantioméricas, entre otros. **En la demostración de Especificidad de un Método Analítico cualitativo para la determinación de impurezas, puede seguirse la misma lógica que en el caso de los ensayos de identidad**, es decir, el Método Analítico será específico en la medida en que:

- Se obtengan resultados positivos a partir de muestras que contienen a la impureza**, por ejemplo, tiempos de retención diferentes para el compuesto original y para su producto de degradación utilizando CLAR. En este caso, si ambos compuestos constituyen el "par crítico" del cromatograma, es indispensable demostrar que la resolución entre ambos picos es cuantitativamente adecuada (Figura 3.3)¹⁰.

- b) **Se obtengan resultados negativos para muestras que no contienen a la impureza.** Adicionalmente, se podrá probar la inexistencia de la señal analítica cuando se adicionen a la muestra cantidades conocidas de sustancias estructuralmente relacionadas a la impureza, por ejemplo, tiempos de retención diferentes para el compuesto original, para el producto de degradación del que se está analizando su presencia en la muestra, y para otros productos de degradación.

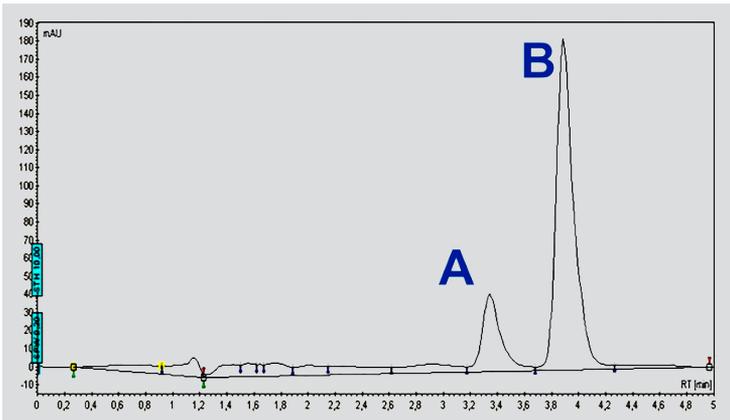


Figura 3.3 Cromatograma del ibuprofeno (B) y su producto de degradación en medio alcalino (A), constituyen el par crítico en la separación cromatográfica¹⁰.

En los casos en los que no se cuenta con las impurezas, no se conocen, o no están disponibles, es posible someter muestras a condiciones de estrés relevantes (tales como luz, humedad, hidrólisis, oxidación, entre otras) y comparar los perfiles de impurezas de las muestras sometidas a estas condiciones con respecto a las muestras originales. Otra posible oportunidad para demostrar la Especificidad del método, es aquella en la cual el método cromatográfico permite la determinación de la "pureza del pico" (detectores de arreglo de fotodiodos- DAD- y espectrómetros de masas- EM), en la que se puede demostrar que una determinada señal se debe única y exclusivamente a un componente.

3.1.4.3 Demostración de la Especificidad en métodos para valoración

En los casos en los que se utilicen métodos que involucran una técnica de separación, tal como la Cromatografía de Gases (CG), Electroforesis Capilar (EC) o CLAR, la primera forma y más sencilla de demostrar la Especificidad es **mediante la comprobación de la separación completa entre todas las señales analíticas obtenidas (analito e impurezas presentes en la muestra), cobrando de nuevo especial relevancia la determinación del valor para la resolución entre picos y, de ser necesario, demostrando la pureza del pico¹⁻⁷.**

En el caso de que el Método Analítico no involucre una técnica de separación que permita la demostración de la separación entre señales analíticas, es posible seguir dos estrategias:

- a) Si se conocen y se cuenta con las impurezas o productos que potencialmente interfirieran en los resultados cuantitativos, es necesario **cuantificar al analito en muestras originales utilizando el Método Analítico a validar y, por otra parte, a dichas muestras, adicionar cantidades conocidas de las impurezas o interferencias y analizar también en estas el contenido del analito aplicando el método correspondiente (muestras adicionadas)**. Resulta lógico pensar que, si las impurezas no interfieren en el Método Analítico, los resultados analíticos obtenidos deberán ser los mismos. En este orden de ideas, hemos propuesto durante años, la posible comprobación de la no afectación de los resultados analíticos partiendo de la siguiente hipótesis:

H₀: Los resultados analíticos promedio obtenidos de las muestras adicionadas no difieren de aquellos obtenidos con muestras originales.

H₁: Los resultados analíticos promedio obtenidos de las muestras adicionadas difieren de aquellos obtenidos con las muestras originales.

Si se cumple la hipótesis nula, entonces se puede expresar en los siguientes términos:

$$H_0: \mu_A = \mu_O \quad \therefore \mu_A - \mu_O = 0$$

$$H_1: \mu_A \neq \mu_O \quad \therefore \mu_A - \mu_O \neq 0$$

Donde:

μ_A = Promedio de la población de resultados de muestras adicionadas con impurezas.

μ_O = Promedio de la población de los resultados de muestras originales.

Si se expresan las hipótesis en esos términos, se puede demostrar la Especificidad llevando a cabo una inferencia para la diferencia de medias, con el uso del estadígrafo t de Student, aplicando la ecuación 3.1¹¹.

$$t = \frac{\bar{y}_A - \bar{y}_O - \Delta_0}{S_p \sqrt{\frac{1}{n_A} + \frac{1}{n_O}}}$$

Ecuación 3.1

Donde:

\bar{y}_A = Promedio de los resultados de muestras adicionadas con impurezas.

\bar{y}_O = Promedio de los resultados de muestras originales.

Δ_0 = Valor de la hipótesis nula, que en este caso es de 0.

S_p = Desviación estándar ponderada de las muestras.

n_A = Número de observaciones para las muestras adicionadas con impurezas.

n_O = Número de observaciones para las muestras originales (sin añadir impurezas).

El cálculo de la desviación estándar ponderada se lleva a cabo partiendo del supuesto de que las varianzas son desconocidas, pero iguales, utilizando para ello la ecuación 3.2.

$$S_p = \sqrt{\left[\frac{((n_A - 1)S_A^2) + ((n_O - 1)S_O^2)}{n_A + n_O - 2} \right]}$$

Ecuación 3.2

Donde:

S_p = Desviación estándar ponderada de las muestras.

n_A = Número de observaciones para las muestras adicionadas con impurezas.

n_O = Número de observaciones para las muestras originales (sin añadir impurezas).

S_A^2 = Varianza de los resultados de las muestras adicionadas con impurezas.

S_O^2 = Varianza de los resultados de las muestras originales (sin añadir impurezas).

Una vez que se obtiene el valor de t calculada para la diferencia de las medias, se contrasta con la t de tablas, comúnmente con un valor de de 0.05, con $(n_A + n_O - 2)$ grados de libertad, y si el valor se sitúa dentro de la zona de no rechazo, se dice que el método es específico. Para ejemplificar esta demostración, se propone analizar los resultados de la Tabla 3.1, relativos a la determinación de Especificidad de un método espectrofotométrico para la valoración de un fármaco. En este ejemplo, se adicionaron a las muestras conteniendo el analito de interés cantidades conocidas de la impureza del compuesto, que es su producto de hidrólisis y su precursor.

Tabla 3.1 Resultados de la determinación de Especificidad de un método espectrofotométrico para la valoración de un fármaco.

Absorbancias de la muestra del fármaco	Absorbancias de la muestra del fármaco adicionada con un 2% de impureza
0.507 0.509 0.514 0.501 0.521 0.523	0.523 0.522 0.517 0.508 0.507 0.506
$\bar{y}_o = 0.5125$ $n_o = 6$ $s_o^2 = 0.0000719$	$\bar{y}_A = 0.5138$ $n_A = 6$ $s_A^2 = 0.0000605$
$t_{calculada} = -0.2837$	
Intervalo de no rechazo de la hipótesis nula: $(-t_{\alpha/2, 10} - t_{1-\alpha/2, 10})$ $(-2.228 - 2.228)$	

Como se pudo apreciar en la Tabla 3.1, al encontrarse el valor de $t_{calculada}$ dentro del intervalo de no rechazo de la hipótesis nula, se concluye que el método es específico.

- b) Si no se conocen o no se cuenta con las impurezas o productos que potencialmente interfirieran en los resultados cuantitativos, la Especificidad deberá demostrarse comparando los resultados de muestras que contienen las impurezas con un segundo Método Analítico ya caracterizado (establecido en la farmacopea o ya validado). Deben incluirse las comparaciones para muestras a las que se haya cometido a condiciones de estrés (temperatura, humedad, luz, hidrólisis, oxidación). La comparación de la equivalencia de resultados analíticos puede llevarse a cabo utilizando diferentes modelos, entre ellos podemos encontrar la prueba bilateral de Schuirmann, que proporciona datos más sólidos para la determinación de equivalencia de resultados¹². La equivalencia se conoce a partir de la construcción de un intervalo de confianza, donde se compara la media de un método de referencia (R) contra la media de un método de prueba (P), con intervalos superior (ε_U) e inferior (ε_L) preestablecidos. La idea es que la diferencia (D) entre los promedios de los resultados de ambos métodos, esté incluida entre los límites preestablecidos¹³.

$$D = \mu_R - \mu_P$$
$$H_0: \varepsilon_L \leq D \leq \varepsilon_U$$

En esta prueba se asume que ambos grupos de valores normalmente distribuidos tienen la misma varianza. El cálculo de los estadísticos necesarios para el establecimiento del intervalo de confianza requiere de las ecuaciones 3.3 y 3.4:

$$TL = \frac{(\bar{y}_R - \bar{y}_P) - \varepsilon_L}{S_p \sqrt{\frac{1}{n_R} + \frac{1}{n_P}}}$$

Ecuación 3.3

Donde:

TL = Valor de t de student para el límite inferior del intervalo de confianza.

\bar{y}_R = Promedio de los resultados analíticos obtenidos con el método de referencia.

\bar{y}_P = Promedio de los resultados analíticos obtenidos con el método de prueba.

ε_L = Límite inferior del intervalo de aceptación para la diferencia entre promedios.

S_p = Desviación estándar ponderada de los resultados analíticos obtenidos.

n_R = número de observaciones para los resultados analíticos obtenidos con el método de referencia.

n_p = número de observaciones para los resultados analíticos obtenidos con el método de prueba.

$$TU = \frac{(\bar{y}_R - \bar{y}_P) - \varepsilon_U}{S_p \sqrt{\frac{1}{n_R} + \frac{1}{n_P}}}$$

Ecuación 3.4

Donde:

TU = Valor de t de student para el límite superior del intervalo de confianza.

\bar{y}_R = Promedio de los resultados analíticos obtenidos con el método de referencia.

\bar{y}_P = Promedio de los resultados analíticos obtenidos con el método de prueba.

ε_U = Límite superior del intervalo de aceptación para la diferencia entre promedios.

S_p = Desviación estándar ponderada de los resultados analíticos obtenidos.

n_R = número de observaciones para los resultados analíticos obtenidos con el método de referencia.

n_p = número de observaciones para los resultados analíticos obtenidos con el método de prueba.

La desviación estándar ponderada se calcula aplicando la ecuación 3.2. Si los valores calculados para TL y TU están fuera de los intervalos de t de tablas calculados con n_R+n_p-2 grados de libertad, se rechaza la hipótesis nula de equivalencia de los resultados analíticos y, por lo tanto, de Especificidad. El cálculo, como pudo observarse, es muy similar al presentado con los resultados de la Tabla 3.1, por lo que no se considera indispensable en este texto realizarlo de nueva cuenta.

3.2 Linealidad del Método Analítico

3.2.1 ¿Qué es la Linealidad de un Método Analítico?

La **Linealidad de un Método Analítico se define como la capacidad del método de análisis para brindar resultados que son directamente proporcionales a la concentración (cantidad) del analito en la muestra**⁴. La FEUM incorpora en esta definición que los resultados deben ser carentes de sesgo (es decir, incorpora de inicio la necesidad de que en dichos resultados el error aleatorio sea despreciable)⁶, lo que es una consideración de suma importancia toda vez que, como se verá más adelante, el incorporar en la definición la necesidad de que el sesgo sea despreciable en la medición, sirve para delimitar la forma de demostrar el cumplimiento de esta característica de desempeño del método.

Es importante hacer notar que el involucrar en el concepto de Linealidad la existencia de una relación directamente proporcional entre la concentración y la respuesta analítica tiende a ser confuso cuando se habla de técnicas analíticas tales como los inmunoanálisis o los métodos de valoración por retroceso, donde la respuesta no es directamente proporcional o disminuye conforme se incrementa la concentración del analito. Sin embargo, toda vez que en la mayoría de los Métodos Analíticos la respuesta se incrementa en función de la concentración del analito, el término de proporcionalidad directa es aceptable y el concepto de Linealidad válido.

3.2.2 ¿Por qué demostrar la Linealidad de un Método Analítico?

La generación de resultados cuantitativos a partir de un Método Analítico requiere un modelo matemático que permita, en un determinado intervalo de valores de concentración o de cantidad del analito presente en la muestra, demostrar que la relación entre dicha concentración y la respuesta es proporcional es decir, por ejemplo, que al incrementar la concentración del analito en la muestra, la respuesta se incrementa o, dicho de otra forma, que la variación de la respuesta en función de la concentración sigue una tendencia predecible mediante un modelo matemático (sea este cual fuere). La carencia de una clara tendencia en la relación concentración vs respuesta en el método

involucraría aleatoriedad en las determinaciones realizadas, haciendo al método carente de certeza en las mediciones obtenidas a partir del mismo.

3.2.3 ¿Para qué tipo de métodos se lleva a cabo la demostración de Linealidad?

La demostración de Linealidad se lleva a cabo, lógicamente, para los métodos de análisis de tipo cuantitativo. Esta demostración debe ser realizada en el intervalo de concentraciones en el que se considera probable obtener un valor para la medición (misma que deberá ser exacta, precisa y, por supuesto, lineal). Ese intervalo de concentraciones se conoce como intervalo de trabajo. Los intervalos de trabajo se pueden definir a partir del propósito (uso) que se le dará al método, de conformidad con lo mencionado en la Tabla 3.2.

3.2.4 ¿Cómo se determina la Linealidad de un Método Analítico?

De manera general, **la determinación de la Linealidad del Método Analítico requiere la demostración de una relación lineal entre una variable dependiente (que puede ser la respuesta analítica o la concentración recuperada) y una variable independiente (la concentración del analito) en el intervalo de trabajo.** Puede realizarse:

- Para el fármaco: **Aplicando el Método Analítico a diluciones de una solución stock del mismo.**
- Para el medicamento: **Aplicando el Método Analítico a pesadas independientes o diluciones de mezclas sintéticas de los componentes del medicamento.**

Tabla 3.2 Intervalos de trabajo recomendados en métodos analíticos de rutina^{1, 4-6}.

Uso del Método	Límite Inferior	Límite superior	Observaciones
Valoración	80% del valor objetivo	120% del valor objetivo	Para materias primas o medicamentos
Uniformidad de contenido	70% del valor objetivo	130% del valor objetivo	Puede considerarse otro intervalo en función de la naturaleza del medicamento (por ejemplo, inhaladores)
Prueba de disolución	± 20% del rango especificado	± 20% del rango especificado	En función del valor esperado para la cantidad disuelta en el tiempo establecido.
Cuantificación de impurezas	Nivel de reporte para la impureza	120% del nivel de reporte para la impureza	De acuerdo con las guías de la ICH, el nivel de reporte de las impurezas está en función de la dosis máxima del fármaco diaria ¹²⁻¹³

La manera más común de demostrar que existe una relación lineal entre una variable dependiente y la variable independiente involucra el análisis de los datos por el método de regresión por mínimos cuadrados.

En este sentido, han de tenerse en cuenta, durante la etapa de la obtención experimental de datos para demostrar la Linealidad, los supuestos que involucra esta técnica, los cuales recordamos a continuación^{11, 14-15}:

- a) Los valores que toma la variable independiente (x) son fijos. Los valores de x son seleccionados previamente por quien realiza la Validación, de conformidad con la demostración de Linealidad en el intervalo de trabajo.
- b) La variable x se mide sin error. En este sentido, no se llevan a cabo correcciones por variaciones en aforos o pesadas.
- c) Existe una serie de valores x para los que se demostrará si existe una relación lineal con respecto a la variable y . En este sentido, es importante mencionar que, mientras que la FEUM es la única referencia de las revisadas para este trabajo en la que se menciona que al menos debe haber tres niveles de concentración en la determinación de Linealidad, en todas las demás consultadas se establece como un mínimo la determinación en cinco niveles de concentración. La lógica del mínimo de cinco niveles de concentración, radica en que es más fácil demostrar una tendencia hacia un determinado modelo de regresión en la medida en la que se cuenta con mayor número de observaciones cerca del valor objetivo.
- d) Para cada valor de x , existe una población de valores y que corresponden a la variable dependiente (respuesta analítica o concentración recuperada). Esto involucra que en cada nivel de concentración incluido en el intervalo para la demostración de Linealidad se lleva a cabo la medición por triplicado (en función de la necesidad de que el valor de n en la ecuación 3.5 sea mayor de 1), y que la distribución de los valores de y para cada valor de x sigue una distribución normal.

$$S^2 = \frac{n \sum_{i=1}^n y_i^2 - (\sum_{i=1}^n y_i)^2}{n(n-1)}$$

Ecuación 3.5

Donde:

S^2 = Varianza de la muestra.

n = Número de observaciones en la subpoblación de valores y .

y_i = Valor para cada observación.

y_i^2 = Cuadrado de cada valor de y .

- e) Las varianzas para las diferentes subpoblaciones de valores y son iguales (es decir, existe homocedasticidad en la regresión). Lo anterior, involucra la necesidad de que la determinación de Linealidad se lleve a cabo en un intervalo de trabajo que involucre como máximo dos órdenes de magnitud (como pudo observarse en la Tabla 3.2), toda vez que de no ocurrir esto la variación de los datos en los diferentes niveles de magnitud no será la misma, haciendo que el método de mínimos cuadrados no brinde la mejor curva de ajuste para los datos⁵. Es posible evitar esta situación al ponderar la variable de respuesta cuando se involucra en la determinación de Linealidad en diferentes órdenes de magnitud; las opciones de ponderación comunes involucran el uso de valores recíprocos de varianza o de desviación estándar.
- f) Todas las medias de las subpoblaciones de y se encuentran sobre la misma línea recta. A esto se le conoce como suposición de Linealidad, que es posible representar de acuerdo con la ecuación 3.6:

$$\mu_{y|x} = \alpha + \beta x$$

Ecuación 3.6

Donde:

$\mu_{y|x}$ = Media de la subpoblación de valores y para un valor específico de x .

α y β = Coeficientes de regresión de la población. En β están todas las medias.

- g) Los valores y son estadísticamente independientes, lo que sugiere que, al extraer una muestra, sería de suponer que los valores de y obtenidos para un valor de x de ninguna manera dependen de los valores de y elegidos para otro valor de x . Experimentalmente implica la obtención de datos de Linealidad a partir de pesadas independientes de la muestra en diferentes niveles de concentración.

Para explicar de una manera más sencilla los procedimientos de análisis de los resultados para la demostración de Linealidad, se trabajará con el ejemplo de un método para la valoración de un principio activo por Espectrofotometría UV, del cual se obtuvieron los datos presentados en la Tabla 3.3 se muestran tanto la respuesta obtenida a cada concentración como la concentración recuperada, obtenida a partir de la aplicación del modelo lineal $y = a + bx$.

De manera inicial, deben obtenerse entonces datos que permitan demostrar la relación respuesta vs concentración o concentración recuperada vs concentración adicionada, como se mencionó anteriormente. **El primer análisis de datos a realizar será la inspección visual del diagrama de dispersión de los valores de y (o una transformación de y como se mencionó anteriormente) contra los valores de x .** Si existiera una relación lineal (Figura 3.4), entonces deberán evaluarse los datos a la luz de un modelo estadístico adecuado, como lo sería en este caso el análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados.

Deben obtenerse, como mínimo, los valores de la pendiente (b , Ecuación 3.7), ordenada al origen (a , Ecuación 3.8), coeficiente de correlación (r , Ecuación 3.9). La forma de calcular cada uno de estos parámetros, se muestra a continuación:

$$b = \frac{n \sum xy - (\sum x)(\sum y)}{n \sum x^2 - (\sum x)^2} \quad \text{Ecuación 3.7}$$

$$a = \frac{\sum y - b \sum x}{n} \quad \text{Ecuación 3.8}$$

$$r = \frac{n \sum x - (\sum x)(\sum y)}{\sqrt{n \sum x^2 - (\sum x)^2} \sqrt{n \sum y^2 - (\sum y)^2}}$$

Ecuación 3.9

Donde:

b = Valor calculado para la pendiente de la curva $y = a+bx$.

n = Número de pares de datos utilizados en la regresión.

$\sum xy$ = Sumatoria del producto de cada valor de x por su respectivo valor de y .

$\sum x$ = Sumatoria de los valores de x .

$\sum y$ = Sumatoria de los valores de y .

$\sum x^2$ = Sumatoria de los cuadrados de los valores de x .

a = Valor calculado para la ordenada al origen.

$\sum xy$ = Sumatoria del producto de cada valor de x por su respectivo valor de y .

r = coeficiente de correlación.

$\sum y^2$ = Sumatoria de los cuadrados de los valores de y .

Para el caso de la pendiente, lo deseable es que:

a) Sea diferente de cero, cuando se analiza la regresión respuesta vs concentración,

H_0 : La pendiente de la curva respuesta vs concentración es igual a cero.

H_1 : La pendiente de la curva respuesta vs concentración es diferente de cero.

La hipótesis nula se puede expresar en los siguientes términos:

$$H_0: \beta_0 = 0$$

$$H_1: \beta \neq 0$$

Tabla 3.3 Resultados de la determinación de Linealidad de un método para la valoración de un principio activo por Espectrofotometría UV.

Concentración	Respuesta	Concentración recuperada
80	0.405	79.950
80	0.408	80.512
80	0.412	81.260
90	0.456	89.495
90	0.463	90.805
90	0.453	88.933
100	0.507	99.039
100	0.508	99.226
100	0.510	99.601
110	0.562	109.333
110	0.564	109.707
110	0.569	110.643
120	0.613	118.877
120	0.624	120.936
120	0.628	121.684

b) No sea diferente de 1, cuando se analiza la regresión concentración recuperada vs concentración adicionada.

H_0 : La pendiente de la curva concentración adicionada vs concentración recuperada es igual a 1.

H_1 : La pendiente de la curva concentración adicionada vs concentración recuperada es diferente de 1.

La hipótesis nula se puede expresar en los siguientes términos:

$$H_0: \beta = 1$$

$$H_1: \beta \neq 1$$

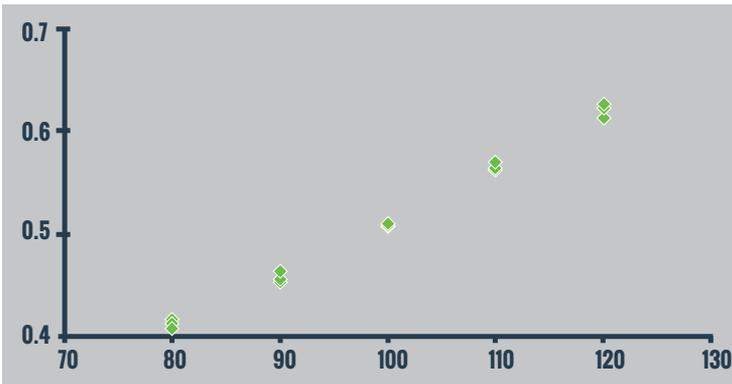


Figura 3.4 Diagrama de dispersión de los resultados de la Tabla 3.2.

Una forma de llevar a cabo la comprobación estadística de cualquiera de estas hipótesis, es mediante la aplicación del estadígrafo t de Student para el parámetro β , que es la pendiente de la regresión lineal (Ecuación 3.10):

$$t = \frac{b - \beta_0}{S_b}$$

Ecuación 3.10

Donde:

t = Valor de la t de student calculada para el estadígrafo.

b = Pendiente calculada para la regresión y vs x .

β_0 = Valor de la hipótesis nula para la pendiente.

S_b = Desviación estándar para el cálculo de la pendiente, se obtiene a partir de la Ecuación 3.11.

$$S_b^2 = \frac{S_{y|x}^2}{\sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{n}}$$

Ecuación 3.11

$$S_{y|x}^2 = \frac{n - 1}{n - 2} (S_y^2 - b^2 S_x^2)$$

Ecuación 3.12

Donde:

$S_{y|x}^2$ = Varianza de la regresión.

n = Número de pares de observaciones.

S_y^2 = Varianza de los valores de y .

S_x^2 = Varianza de los valores de x .

b = Pendiente calculada para la regresión y vs x .

\bar{x} = Promedio de los valores de x .

Retomando el ejemplo, con los datos de la Tabla 3.3, se pueden obtener los valores de regresión por mínimos cuadrados mostrados en la Tabla 3.4 para la curva respuesta vs concentración:

Tabla 3.4 Resultados obtenidos de la regresión respuesta vs concentración con los datos de la Tabla 3.3.

Pendiente	$b = 0.00534$
Ordenada al origen	$a = -0.022$
Coefficiente de correlación	$r = 0.9961$
Número de observaciones	$n = 15$
Varianza de los valores de y	$S_y^2 = 0.00614$
Varianza de los valores de x	$S_x^2 = 214.2857$
Promedio de los valores de x	$\bar{x} = 100$
Sumatoria de los valores de x	$\sum x_j = 1500$
Sumatoria al cuadrado de los valores de x	$(\sum x_j)^2 = 2250000$
Sumatoria de los valores de x al cuadrado	$\sum x_j^2 = 153000$

Con los resultados de la Tabla 3.4, se puede calcular:

$$S_{y|x}^2 = \frac{n-1}{n-2} (S_y^2 - b^2 S_x^2) = \frac{15-1}{15-2} (0.00614 - (0.00534^2 \times 212.2857)) = 2.5238 \times 10^{-5}$$

$$S_b^2 = \frac{S_{y|x}^2}{\sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{n}} = \frac{2.5238 \times 10^{-5}}{153000 - \frac{2250000}{15}} = 8.4128 \times 10^{-9}$$

$$S_b = \sqrt{S_b^2} = 9.1721 \times 10^{-5}$$

$$t = \frac{b - \beta_0}{S_b} = \frac{0.00534 - 0}{9.1721 \times 10^{-5}} = 58.2561$$

Una vez determinado el valor correspondiente para t, puede obtenerse el valor de t de tablas para n-2 grados de libertad, normalmente con un valor de $\alpha=0.05$, y a partir de la construcción de la región de no rechazo de la hipótesis nula y la contrastación de la hipótesis, saber si se cumple con la especificación para la pendiente.

$$t_{1-\alpha/2,13} = 2.1604$$

$$t_{\alpha/2,13} = -2.1604$$

En este caso, si la hipótesis nula fue que $\beta=0$, y el valor de t calculado fue de 58.2561, es notorio que rebasa por mucho el intervalo de no rechazo, por lo que se rechaza la hipótesis nula y la pendiente es diferente de cero, con un 95% de confianza.

Por otra parte, **para el caso de la ordenada al origen es de esperarse**, de conformidad con la definición establecida por la FEUM, en la que se establece que el sesgo sea despreciable⁶, **que su valor sea estadísticamente igual a cero**, es decir, que cuando no exista analito en la muestra, no haya señal analítica alguna:

H_0 : La ordenada al origen de la curva respuesta vs concentración es igual a cero .

H_1 : La ordenada al origen de la curva respuesta vs concentración es diferente de cero.

Las hipótesis se pueden expresar en los siguientes términos:

$$H_0: \alpha = 0$$

$$H_1: \alpha \neq 0$$

Para demostrar estadísticamente si la ordenada al origen es igual a cero, podemos recurrir la aplicación del estadígrafo t de Student para un valor esperado de y, en este caso la ordenada al origen (Ecuación 3.13)¹⁴:

$$t = \frac{a_0 - \alpha}{S_{y|x} \sqrt{1 + \frac{1}{n} + \frac{(x_p - \bar{x})^2}{\sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{n}}}}$$

Ecuación 3.13

Donde:

t = Valor de la t de student calculada para el estadígrafo a.

a_0 = Valor estimado de los datos de regresión para la ordenada al origen.

α = Valor de la hipótesis nula para la ordenada al origen.

$S_{y|x}$ = Desviación estándar inexplicada a partir de los datos de la muestra.

x_p = Valor particular de x en el que se desea obtener un intervalo de predicción para y.

Si se retoman los datos de la Tabla 3.3 y los resultados de la Tabla 3.4, se puede calcular el valor de t para la hipótesis nula =0.

$$t = \frac{a_0 - \alpha}{S_{y|x} \sqrt{1 + \frac{1}{n} + \frac{(x_p - \bar{x})^2}{\sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{n}}}} = \frac{-0.022 - 0}{\sqrt{2.5238 \times 10^{-5}} \sqrt{1 + \frac{1}{15} + \frac{(0 - 100)^2}{153000 - \frac{2250000}{15}}}} = -2.10$$

Una vez determinado el valor correspondiente para t, puede obtenerse el valor de t de tablas para n-2 grados de libertad, normalmente con un valor de $\alpha=0.05$, y a partir de la construcción de la región de no rechazo de la hipótesis nula y la contrastación de la hipótesis, saber si se cumple con la especificación para la ordenada al origen.

$$t_{1-\alpha/2,13} = 2.1604$$

$$t_{\alpha/2,13} = -2.1604$$

En este caso, si la hipótesis nula fue que $\alpha=0$, y el valor de t calculado fue de -2.10, el valor de t se encuentra dentro del intervalo de no rechazo, por lo que no se rechaza hipótesis nula y la ordenada al origen es igual a cero, con un 95% de confianza.

Para el coeficiente de correlación, se espera que su valor sea mayor o igual a 0.99, en el entendido de que el modelo lineal al que se ajustaron los datos debe permitir explicar en su mayoría la dispersión de los mismos con respecto al valor promedio de las observaciones. Como puede observarse, para el ejemplo, el valor de coeficiente de correlación supera la especificación.

El análisis del ajuste al modelo a través del valor del coeficiente de correlación, puede ir acompañado de un análisis gráfico de los valores residuales de y para cada valor dado de x. Los valores residuales de y se calculan utilizando la ecuación 3.14:

$$\text{Residual} = \hat{y} - y$$

Ecuación 3.14

Donde:

\hat{y} = Valor predicho para la respuesta a partir del modelo lineal.

y = Valor observado para la respuesta.

En la evaluación visual de una gráfica de residuales (Figura 3.5) no debe observarse un patrón establecido para los mismos¹³⁻¹⁴.

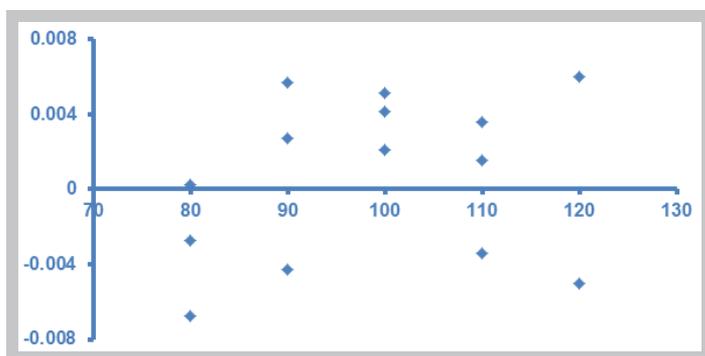


Figura 3.5 Gráfica de residuales para los datos de la Tabla 3.2

A manera de resumen, para demostrar la Linealidad de un Método Analítico, deben cumplirse los requisitos establecidos en este Capítulo, una pendiente diferente de cero, una ordenada al origen igual a cero y un coeficiente de correlación mayor a 0.99, para la relación respuesta vs concentración.

3.3 Precisión del Método Analítico

3.3.1 ¿Qué es la precisión del Método Analítico?

La precisión de un Método Analítico se define como el grado de dispersión que existe entre una serie de mediciones del analito obtenidas a partir de la aplicación del Método Analítico a múltiples alícuotas de la misma muestra homogénea⁴. De acuerdo con la FEUM⁵, es el grado de concordancia relativa entre los resultados obtenidos al aplicar el Método Analítico, utilizando una muestra homogénea. Cuando no es posible determinar la precisión en muestras homogéneas debido a la dificultad de su obtención (por ejemplo, cuando se tiene que adicionar una impureza que está en solución a un polvo), puede determinarse utilizando muestras artificiales o soluciones de la muestra¹.

La precisión del método, de manera general, se puede demostrar en tres niveles, que son la repetibilidad, la Reproducibilidad y la Precisión Intermedia⁴⁻⁶.

- La **repetibilidad se refiere al grado de dispersión de los resultados analíticos obtenidos a partir del análisis múltiple de la misma muestra homogénea bajo las mismas condiciones de operación del método** (laboratorio, analista, día, equipo de medición) en un intervalo corto de tiempo. Se le denomina también precisión intra-ensayo.
- La **Reproducibilidad**, por su parte, **se refiere al grado de dispersión de los resultados analíticos obtenidos a partir del análisis múltiple de la misma muestra homogénea al variar en su totalidad las condiciones de operación del método**, lo cual se consigue al variar los laboratorios donde se aplica el mismo.
- La **Precisión Intermedia**, por consiguiente, correspondería a un nivel "intermedio" de variación de las condiciones normales de operación del método. Se refiere al **grado de dispersión de los resultados analíticos obtenidos a partir del análisis múltiple de la misma muestra homogénea variando condiciones de operación del método** (analista, día, equipo de medición, entre otras) dentro de un mismo laboratorio.

3.3.2 ¿Por qué demostrar la precisión de un Método Analítico?

En la sección 2.1.2 de este libro, se habló de manera general de los diferentes tipos de error en el método de análisis. Mientras que durante el estudio de Linealidad se puede demostrar la existencia o no de error sistemático, **es durante la determinación de la precisión que se busca llegar a conocer la magnitud de error aleatorio a partir de las variaciones en las observaciones repetidas del mensurando, determinadas en múltiples ocasiones**^{3,16}. Como ya se mencionó anteriormente, este tipo de error no puede ser compensado de forma alguna, pero es necesario conocer su magnitud para determinar si el Método Analítico no sobrepasará un límite de variación por encima del cual no sea apto para su uso; este límite de variación, podrá definirse por el laboratorio en el que se aplica el método, en función de la aplicación del mismo, el tipo de sistema analítico y la complejidad del procedimiento analítico.

Ahora bien, es importante hacer notar **que la demostración de la precisión en cada uno de los niveles definidos en la sección 3.2.1 persigue un objetivo diferente de acuerdo con las necesidades de aplicación del**

método. Mientras que en la determinación de repetibilidad se busca conocer la medida de la variación aleatoria de los resultados analíticos en la misma corrida analítica, para tener una estimación de la variabilidad cotidiana del método, que nos permitirá conocer la variación esperada cuando llevamos a cabo las determinaciones por duplicado, triplicado, etc., y en la determinación de Precisión Intermedia se requiere demostrar la forma en que la variación de factores intrínsecos al laboratorio (analista, equipo, día, entre otros) afectan también los resultados del análisis en el trabajo cotidiano, en la determinación de la Reproducibilidad se busca conocer si la variación aleatoria de los resultados es diferente entre dos o más laboratorios que trabajan el mismo método, normalmente en un estudio colaborativo, que tiene la finalidad de estandarizar una determinada metodología o de lograr la transferencia del método de análisis de un laboratorio a otro¹⁻¹⁶⁻¹⁷.

3.3.3 ¿Para qué tipo de métodos se lleva a cabo la demostración de precisión?

La demostración de precisión, al igual que en el caso de Linealidad, **se lleva a cabo para los métodos de análisis de tipo cuantitativo.** Esta demostración debe ser realizada también en el intervalo de concentraciones en el que se considera probable obtener un valor para la medición, que ya se había definido como intervalo de trabajo, de conformidad con lo mencionado en la Tabla 3.2.

3.3.4 ¿Cómo se determina la precisión de un Método Analítico?

La demostración de precisión del método dependerá del nivel de precisión que se requiera determinar, como se especificará a continuación.

3.3.4.1 Demostración de la repetibilidad del Método Analítico

De manera general, se establece que **la repetibilidad del Método Analítico ha de demostrarse^{1,4}:**

- a) **Utilizando un mínimo de nueve determinaciones que cubran el intervalo especificado de trabajo para el Método Analítico** (es decir, 3 réplicas de la determinación para 3 concentraciones en los niveles alto, medio y bajo del intervalo de trabajo), o

b) Utilizando un mínimo de seis determinaciones en el centro del intervalo de trabajo (100% de la concentración de prueba).

Se recomienda que la demostración de repetibilidad se realice de acuerdo con lo establecido en el inciso b) si se realizaron las determinaciones utilizando muestras auténticas. Si se utilizaron muestras artificiales, es más recomendable realizar la demostración de acuerdo con el inciso a), en términos de fortalecer la evidencia del grado de concordancia de las mediciones en todo el intervalo de trabajo. En cualquiera de los casos, la repetibilidad se evalúa mediante la determinación del coeficiente de variación (Ecuación 3.15) de la respuesta analítica a cada nivel de concentración, o del coeficiente de variación del porcentaje de recobro (%R, Ecuación 3.16⁷) del analito, mismo que deberá cumplir con un criterio determinado establecido de antemano, como ya se mencionó.

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

Ecuación 3.15

Donde:

CV = Coeficiente de Variación.

S_y = Desviación estándar de las respuestas analíticas o de los porcentajes de recobro.

\bar{y} = Promedio de las respuestas analíticas o de los porcentajes de recobro.

$$\%R = \frac{\text{Concentración recuperada}}{\text{Concentración adicionada}} \times 100$$

Ecuación 3.16

Como un ejemplo, para la determinación de repetibilidad del método se utilizarán los resultados mostrados en la Tabla 3.5, considerando que el valor preestablecido para los coeficientes de variación de la respuesta analítica o del %R es de 2.0% para concluir que el método es repetible. En este ejemplo, se tomaron como base los resultados mostrados en la Tabla 3.2.

Como puede observarse en la Tabla 3.5, el resultado del CV tanto para la respuesta analítica por nivel como para el %R en todos los niveles es menor al valor establecido de 2%, por lo que el método sería repetible en este caso.

Tabla 3.5 Ejemplo de la determinación de repetibilidad para un Método Analítico utilizado para la valoración de un fármaco en tabletas por Espectrofotometría UV.

Concentración	Respuesta analítica	Concentración recuperada	%CV para la respuesta analítica en cada nivel de concentración	%R	%CV para %R en los tres niveles de concentración
80	0.405	79.95	0.81	99.93	0.99
80	0.408	80.51		100.64	
80	0.412	81.26		101.57	
100	0.507	99.03	0.29	99.03	
100	0.508	99.22		99.22	
100	0.510	99.60		99.60	
120	0.613	118.87	1.25	99.06	
120	0.624	120.93		100.78	
120	0.628	121.68		101.40	

3.3.4.2 Demostración de la Precisión Intermedia del Método Analítico

Antes de comenzar con esta sección, es importante establecer que las fuentes de variación a incluir en la demostración de la Precisión Intermedia y los valores que pueden tomar dichas fuentes de variación, dependen de las necesidades del laboratorio en que se aplicará el método y no de una fórmula estandarizada. Por ejemplo, si en un laboratorio todos los analistas trabajan con un instrumento analítico único, no hay razón o forma de buscar determinar la Precisión Intermedia usando diferentes instrumentos, pero si en otro laboratorio se cuenta con diversos instrumentos y analistas para llevar a cabo las determinaciones con un método de análisis, deberá considerarse si la combinación de factores analista-equipo es pertinente para asegurar la Precisión Intermedia del método.

En la FEUM⁶, se establece que la demostración de Precisión Intermedia del Método Analítico se llevará a cabo a partir del análisis de "por lo menos tres alícuotas tomadas de una muestra homogénea, para ser analizadas en diferentes días (mínimo dos) y por diferentes analistas (mínimo dos)". Posteriormente, el análisis de los datos involucrará la determinación del coeficiente de variación de todos los resultados analíticos, el cual debe cumplir con el criterio de aceptación establecido. No se especifica en qué nivel de concentración se debe hacer la determinación, por lo que es posible inferir que se realizará en el nivel central del intervalo de trabajo. Es importante mencionar en este caso, que esta sería la forma más sencilla de demostrar Precisión Intermedia, en el entendido de que basta con que los valores de CV (ecuación 3.15) estén considerados dentro del intervalo aceptable, en las combinaciones posibles de las fuentes de variación i -ésimo analista (A_i) y j -ésimo día (D_j) para que se concluya que el método presenta Precisión Intermedia. En la Tabla 3.6, se ejemplifica la determinación de Precisión Intermedia de acuerdo con la especificación de la FEUM.

En todos los casos de la Tabla 3.6 el valor de CV es menor a la especificación ya establecida (2%), por lo que se podría concluir en ese caso que el método presenta Precisión Intermedia. A pesar de lo anterior, es necesario señalar que debe cuidarse el hecho de no solamente concluir sobre los valores de CV sin un juicio adicional de análisis de datos, ya que podría no tenerse en cuenta la posibilidad de que los resultados, aun cumpliendo con el criterio de CV menor a la especificación, no fueran comparables entre sí. Para ilustrar esto, se proponen los valores de la Tabla 3.7, donde es notorio que el valor de CV cumple con el requisito de estar comprendido en el intervalo de aceptación (2%) propuesto, pero los valores promedio de las absorbancias para el analista 1 en el día 2, así como para el analista 2

en el día 1, son claramente diferentes a los de las otras dos combinaciones analista-día. Para evitar este tipo de errores, **no es poco común encontrar que, en vez de la comparación de los valores de CV de forma directa para las combinaciones de fuentes de variación, se proponga el análisis de varianza (ANAEVA) para demostrar estadísticamente la Precisión Intermedia^{4, 7, 18}.**

Tabla 3.6 Determinación de Precisión Intermedia de acuerdo con los criterios de la FEUM para un Método Analítico utilizado para la valoración de un fármaco en tabletas por Espectrofotometría UV.

Analista	Día	Resultados (Absorbancias)	CV (%)
1	1	0.503 0.508 0.511	0.79
1	2	0.506 0.505 0.513	0.86
2	1	0.514 0.516 0.511	0.49
2	2	0.507 0.501 0.511	0.99

En la determinación de la Precisión Intermedia, se parte de manera general de un modelo estadístico donde se establece que los resultados analíticos obtenidos con un determinado método dependerán de las fuentes de variación en el estudio de Precisión Intermedia (Ecuación 3.17). Por ejemplo, retomando el ejemplo de los datos de la Tabla 3.6, con dos analistas trabajando en dos días, se puede establecer el siguiente modelo:

Tabla 3.7 Determinación de Precisión Intermedia de acuerdo con los criterios de la FEUM para un Método Analítico utilizado para la valoración de un fármaco en tabletas por Espectrofotometría UV, ejemplo 2.

Analista	Día	Resultados (Absorbancias)	CV (%)
1	1	0.503 0.508 0.511	0.79
1	2	0.566 0.565 0.573	0.76
2	1	0.574 0.576 0.571	0.44
2	2	0.507 0.501 0.511	0.99

$$y_{ijk} = \mu + A_i + D_j + AD_{ij} + e_{k(ij)}$$

Ecuación 3.17

Donde:

y_{ijk} = k-ésima observación obtenida por el i-ésimo analista en el j-ésimo día.

μ = Media poblacional de las observaciones obtenidas aplicando el método analítico.

A_i = Efecto del i-ésimo analista en el resultado analítico.

D_j = Efecto del j-ésimo día en el resultado analítico.

AD_{ij} = Efecto de la interacción del i-ésimo analista y el j-ésimo día en la respuesta analítica.

$e_{k(ij)}$ = Error experimental de la k-ésima observación realizada por el i-ésimo analista en el j-ésimo día.

Las hipótesis nulas que se desean probar para demostrar que el Método Analítico presenta Precisión Intermedia son:

$$H_0: A_1 = A_2$$

$$H_1: A_1 \neq A_2$$

$$H_0: D_1 = D_2$$

$$H_1: D_1 \neq D_2$$

La hipótesis:

$$H_0: A_1 D_1 = A_2 D_2 = A_1 D_2 = A_2 D_1$$

Se comprueba con la finalidad de demostrar si la aplicación del modelo estadístico fue adecuada.

Para el análisis de los datos, se construye la tabla de ANADEV, como se muestra en la Tabla 3.8, para el modelo de efectos fijos (aquel en el que los niveles que toma la fuente de variación y los experimentos han sido establecidos y controlados por el experimentador, y las conclusiones sobre el mismo son válidas solamente en el intervalo probado^{14, 19}). Los cálculos requeridos son:

$$SC_A = \frac{\sum_{i=1}^n y_{i..}^2}{jk} - \frac{y_{...}^2}{ijk}$$

Ecuación 3.18

Donde:

$\sum_{i=1}^n y_{i..}^2$ = Sumatoria elevada al cuadrado de los datos obtenidos para cada analista sin importar día o réplica.

$y_{...}^2$ = Cuadrado de la sumatoria de todos los valores obtenidos.

i = Número de analistas.

j = Número de días.

k = Número de réplicas.

Tabla 3.8 Análisis de varianza del modelo de efectos fijos para demostrar Precisión Intermedia.

Fuente de Variación	Grados de Libertad (g.l.)	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F calculada	F Tablas
Analista	(i-1)	SC _A	$MC_A = \frac{SC_A}{g.l._A}$	$\frac{MC_A}{MC_e}$	$(F_{(\alpha/2, g.l.A, g.l.e)})^{-1}$ $F_{(1-\alpha/2, g.l.A, g.l.e)}$
Día	(j-1)	SC _D	$MC_D = \frac{SC_D}{g.l._D}$	$\frac{MC_D}{MC_e}$	$(F_{(\alpha/2, g.l.A, g.l.e)})^{-1}$ $F_{(1-\alpha/2, g.l.A, g.l.e)}$
Interacción Analista-Día	(i-1) (j-1)	SC _{AD}	$MC_{AD} = \frac{SC_{AD}}{g.l._{AD}}$	$\frac{MC_{AD}}{MC_e}$	$(F_{(\alpha/2, g.l.A, g.l.e)})^{-1}$ $F_{(1-\alpha/2, g.l.A, g.l.e)}$
Error	(k-1)(ij)	SC _e	$MC_e = \frac{SC_e}{g.l._e}$		

i = Número de analistas.

j = Número de días.

k = Número de réplicas por cada combinación de los factores analista-día.

α se fija comúnmente con un valor de 0.05.

$$SC_D = \frac{\sum_{j=1}^n y_{j.}^2}{ik} - \frac{y_{...}^2}{ijk}$$

Ecuación 3.19

Donde:

$\sum_{j=1}^n y_{j.}^2$ = Sumatoria elevada al cuadrado de los datos obtenidos para cada día sin importar analista o réplica.

$$SC_{AD} = \frac{\sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n y_{ij.}^2}{k} - \frac{\sum_{i=1}^n y_{i..}^2}{jk} - \frac{\sum_{j=1}^n y_{.j.}^2}{ik} + \frac{y_{...}^2}{ijk}$$

Ecuación 3.20

Donde:

$\sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n y_{ij.}^2$ = Sumatoria elevada al cuadrado de los datos obtenidos para cada combinación analista-día sin importar la réplica.

$$SC_e = \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n \sum_{k=1}^n y_{ijk}^2 - \frac{\sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n y_{ij.}^2}{k}$$

Ecuación 3.21

Donde:

$\sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n \sum_{k=1}^n y_{ijk}^2$ = Sumatoria del cuadrado del valor de cada resultado analítico.

Si se llevan a cabo los diferentes cálculos, utilizando los valores de la Tabla 3.6, se obtiene la Tabla de ANADEVVA 3.9.

Tabla 3.9 Análisis de varianza del modelo de efectos fijos para demostrar Precisión Intermedia, utilizando los datos de la Tabla 3.6.

Fuente de Variación	Grados de Libertad (g.L.)	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	$F_{\text{calculada}}$	F_{Tablas}
Analista	$(i-1)=1$	$SC_A=1.63 \times 10^{-5}$	$MC_A=1.63 \times 10^{-5}$	0.97	(0.13-7.57)
Día	$(j-1)=1$	$SC_D=3.33 \times 10^{-5}$	$MC_D=3.33 \times 10^{-5}$	1.99	
Interacción Analista-Día	$(i-1)(j-1)=1$	$SC_{AD}=4.80 \times 10^{-5}$	$MC_{AD}=4.80 \times 10^{-5}$	2.87	
Error	$(k-1)(ij)=8$	$SC_e=1.34 \times 10^{-4}$	$MC_e=1.67 \times 10^{-5}$		

A partir de la tabla de ANADEV, se puede concluir que el Método Analítico presenta Precisión Intermedia, toda vez que los valores de $F_{\text{calculada}}$ para los factores analista y día se encuentran comprendidos en la región de no rechazo establecida de acuerdo con el modelo, con una confianza del 95%. Así mismo, como la $F_{\text{calculada}}$ para la interacción analista-día se encuentra también en la región de no rechazo, se concluye que el modelo con el que se analizaron los datos es el correcto.

Para verificar la versatilidad de la aplicación del ANADEV en los cálculos de Precisión Intermedia, se empleará ahora el mismo procedimiento, pero con los datos de la Tabla 3.7. Los resultados obtenidos, presentados en la Tabla 3.10, permiten observar que hay una clara interacción entre los

factores Analista y Día (Figura 3.6), como ya se podía suponer a partir de la observación directa de los datos originales. Al hacerse evidente dicha interacción, resulta claro que el modelo estadístico al que se tratan de ajustar los datos no es el correcto.

Cuando se observa una situación como la que se presentó con el ANADEVa de los datos de la Tabla 3.7, o cuando de antemano se sabe que uno de los factores depende de los niveles de otro factor como, por ejemplo, cuando en el laboratorio trabajan dos analistas, pero el analista 1 trabaja lunes y martes, y el analista 2 trabaja miércoles y jueves (es decir, el factor día está anidado en el factor analista), el modelo estadístico debe de considerar ya esta situación, por lo que se puede establecer un planteamiento como el que se presenta en la ecuación 3.22.

Tabla 3.10 Análisis de varianza del modelo de efectos fijos para demostrar Precisión Intermedia, utilizando los datos de la Tabla 3.7

Fuente de Variación	Grados de Libertad (g.L.)	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F calculada	F Tablas
Analista	$(i-1)=1$	$SC_A=1.63 \times 10^{-5}$	$MC_A=1.63 \times 10^{-5}$	0.97	(0.13-7.57)
Día	$(j-1)=1$	$SC_D=3.33 \times 10^{-5}$	$MC_D=3.33 \times 10^{-5}$	1.99	
Interacción Analista-Día	$(i-1)(j-1)=1$	$SC_{AD}=1.23 \times 10^{-2}$	$MC_{AD}=1.23 \times 10^{-2}$	733.61	
Error	$(k-1)(ij)=8$	$SC_e=1.34 \times 10^{-4}$	$MC_e=1.67 \times 10^{-5}$		

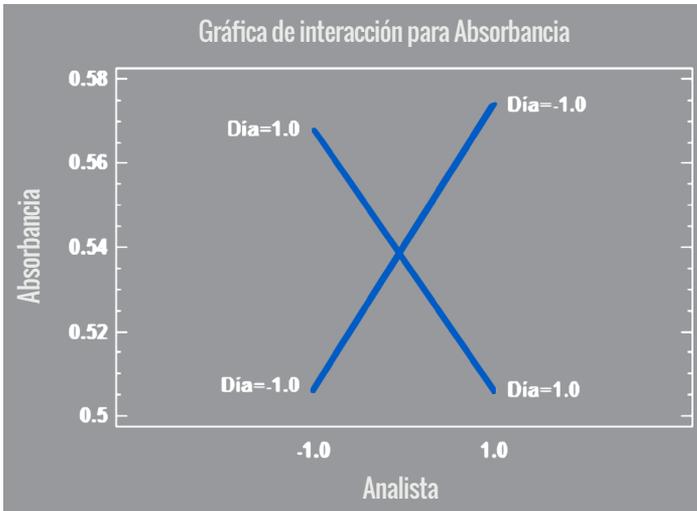


Figura 3.6 Gráfica de interacción de factores analista-día, generada con el programa Statgraphics Centurion XVII.

$$y_{ijk} = \mu + A_i + D_{j(i)} + e_{k(ij)}$$

Ecuación 3.22

Donde:

y_{ijk} = k-ésima observación obtenida por el i-ésimo analista en el j-ésimo día.

μ = Media poblacional de las observaciones obtenidas aplicando el método analítico.

A_i = Efecto del i-ésimo analista en el resultado analítico.

$D_{j(i)}$ = Efecto del j-ésimo día dentro del i-ésimo analista en el resultado analítico.

$e_{k(ij)}$ = Error experimental de la k-ésima observación realizada por el i-ésimo analista en el j-ésimo día.

}

Las hipótesis nulas que se desean probar para demostrar que el Método Analítico presenta Precisión Intermedia son:

$$H_0: A_1 = A_2$$

$$H_0: D_{1(A1)} = D_{2(A1)} = D_{2(A2)} = D_{1(A2)}$$

La hipótesis:

$$H_0: A_1 D_1 = A_2 D_2 = A_1 D_2 = A_2 D_1$$

Ya no se comprueba, toda vez que la interacción analista-día queda explícita en el modelo estadístico.

Para el análisis de los datos, se construye la tabla de ANADEVAs, como se muestra en la Tabla 3.11, para el modelo de efectos fijos (aquel en el que los niveles que toma la fuente de variación y los experimentos han sido establecidos y controlados por el experimentador y las conclusiones sobre el mismo son válidas solamente en el intervalo probado¹³), pero con el factor día anidado en el factor analista. Los cálculos iniciales requeridos son la suma de cuadrados del analista y del día, que se obtienen con la aplicación de las ecuaciones 3.18 y 3.21, y la suma de cuadrados del día anidado en el analista, que se obtiene de acuerdo con lo establecido en la ecuación 3.23:

$$SC_{D(A)} = \frac{\sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n y_{ij}^2}{k} - \frac{\sum_{i=1}^n y_{i..}^2}{jk}$$

Ecuación 3.23

Si se llevan a cabo los diferentes cálculos de acuerdo con lo establecido en la Tabla 3.11, utilizando los resultados de la Tabla 3.7, se obtiene la Tabla de ANADEVAs 3.12.

Tabla 3.11 Análisis de varianza del modelo de efectos fijos para demostrar Precisión Intermedia con un factor anidado.

Fuente de Variación	Grados de Libertad (g.L.)	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F calculada	F Tablas
Analista	(i-1)	SC _A	$MC_A = \frac{SC_A}{g.L._A}$	$\frac{MC_A}{MC_e}$	$(F_{(\alpha/2, g.L.A, g.L.e)} - F_{(1-\alpha/2, g.L.A, g.L.e)})$
Día	(j-1)(i)	SC _{D(A)}	$MC_{D(A)} = \frac{SC_{D(A)}}{g.L._{D(A)}}$	$\frac{MC_{D(A)}}{MC_e}$	$(F_{(\alpha/2, g.L.D(A), g.L.e)} - F_{(1-\alpha/2, g.L.D(A), g.L.e)})$
Error	(k-1)(ij)	SC _e	$MC_e = \frac{SC_e}{g.L._e}$		

i= Número de analistas

j= Número de días

k=Número de réplicas por cada combinación de los factores analista-día se fija comúnmente con un valor de 0.05

A partir de la tabla del ANADEVa de la Tabla 3.12, se puede concluir que el Método Analítico presenta Precisión Intermedia entre analistas, toda vez que el valor de $F_{calculada}$ se encuentra comprendido en la región de no rechazo establecida de acuerdo con el modelo, con una confianza del 95%. Así mismo, como la $F_{calculada}$ para el factor día anidado en el factor analista se encuentra fuera de la región de no rechazo, se concluye que no existe Precisión Intermedia entre días.

Tabla 3.12 Análisis de varianza del modelo de efectos fijos para demostrar Precisión Intermedia, utilizando los datos de la Tabla 3.7, con el factor día anidado en el factor analista.

Fuente de Variación	Grados de Libertad (g.L.)	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F calculada	F _{Tablas}
Analista	(i-1)=1	$SC_A=1.63 \times 10^{-5}$	$MC_A=1.63 \times 10^{-5}$	0.97	(0.13-7.57)
Día	(ij)(i)=2	$SC_{AD}=1.23 \times 10^{-2}$	$MC_{AD}=6.16 \times 10^{-3}$	368.90	(0.16-6.06)
Error	(k-1)(ij)=8	$SC_e=1.34 \times 10^{-4}$	$MC_e=1.67 \times 10^{-5}$		

3.3.4.3 Demostración de la Reproducibilidad del Método Analítico

En la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos no existe especificación ni metodología precisa para demostrar la Reproducibilidad de un Método Analítico, se señala de manera general en el apartado de Tolerancia, a pesar de que se establece, en la propuesta de nuevos Métodos Analíticos, que *"A criterio de la CPFEUM se revisará parcial o totalmente la documentación de la Validación del método propuesto y se realizará un estudio colaborativo"*⁶. Una definición de un estudio colaborativo, se puede encontrar en el documento publicado en 2002 por el Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos AC, donde se establece que es *"la Reproducibilidad realizada en diferentes laboratorios, por diferentes químicos"*²⁰. En este orden de ideas, **la demostración de Reproducibilidad del método, requiere de manera forzosa la comprobación del grado de**

concordancia entre los resultados analíticos obtenidos en diferentes laboratorios, aplicando el mismo método de análisis a la misma muestra homogénea¹; sin embargo, no existe un lineamiento general para llevar a cabo la demostración.

Con base en lo anterior, es posible entonces partir de manera general de un modelo estadístico donde se establezca que los resultados analíticos obtenidos con un determinado método dependerán de la fuente de variación laboratorio (Ecuación 3.23).

$$y_{ij} = \mu + L_i + e_{j(i)} \quad \text{Ecuación 3.23}$$

Donde:

y_{ij} = j-ésima observación obtenida en el i-ésimo laboratorio.

μ = Media poblacional de las observaciones obtenidas aplicando el método analítico.

L_i = Efecto del i-ésimo laboratorio en el resultado analítico.

$e_{j(i)}$ = Error experimental de la j-ésima observación realizada en el i-ésimo laboratorio.

La hipótesis nula que se desea probar para demostrar que el Método Analítico presenta Reproducibilidad, si se realizara el método en dos laboratorios (Laboratorio 1 y Laboratorio 2) es:

$$H_0: L_1 = L_2$$

$$H_1: L_1 \neq L_2$$

Para el análisis de los datos, se construye la tabla de ANADEVIA, como se muestra en la Tabla 3.13, para el modelo de efectos fijos.

Tabla 3.13 Análisis de varianza del modelo de efectos fijos para demostrar Reproducibilidad.

Fuente de Variación	Grados de Libertad (g.l.)	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F calculada	F Tablas
Laboratorio	(i-1)	SC _L	$MC_L = \frac{SC_L}{g.l.L}$	$\frac{MC_L}{MC_e}$	$(F_{(\alpha/2, g.l.L, g.l.e)})^{-1}$ $F_{(1-\alpha/2, g.l.L, g.l.e)}$
Error	(j-1)(i)	SC _e	$MC_e = \frac{SC_e}{g.l.e}$		

i= Número de laboratorios.

j= Número de réplicas en cada laboratorio se fija comúnmente con un valor de 0.05.

Los cálculos requeridos son:

$$SC_L = \frac{\sum_{j=1}^n y_j^2}{j} - \frac{y_{..}^2}{jk}$$

Ecuación 3.24

Donde:

$\sum_{i=1}^n y_j^2$ = Sumatoria elevada al cuadrado de los datos obtenidos para cada laboratorio sin importar día o réplica.

$y_{..}^2$ = Cuadrado de la sumatoria de todos los valores obtenidos.

$$SC_e = \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n y_{ij}^2 - \frac{\sum_{i=1}^n y_i^2}{j}$$

Ecuación 3.25

Donde:

$\sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n y_{ij}^2$ = Sumatoria del cuadrado del valor de cada resultado analítico.

Para ejemplificar el cálculo, se cuenta con los resultados de la Tabla 3.14 para la demostración de Reproducibilidad de un Método Analítico, realizado en dos laboratorios, por sextuplicado en cada uno de ellos.

Tabla 3.14 Determinación de Reproducibilidad para un Método Analítico utilizado para la valoración de un fármaco en tabletas por Espectrofotometría UV.

Laboratorio	Resultados (Absorbancias)		CV (%)
1	0.503 0.508 0.511	0.514 0.516 0.511	0.89
2	0.506 0.505 0.513	0.507 0.501 0.511	0.85

Si se llevan a cabo los diferentes cálculos, utilizando los valores de la Tabla 3.14, se obtiene la Tabla de ANADEV A 3.15.

Tabla 3.15 Análisis de varianza del modelo de efectos fijos para demostrar Reproducibilidad.

Fuente de Variación	Grados de Libertad (g.L.)	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F calculada	F Tablas
Laboratorio	$(i-1)=1$	$SC_L=3.33 \times 10^{-5}$	$MC_L=3.33 \times 10^{-5}$	1.68	(0.14-6.94)
Error	$(j-1)(i)=10$	$SC_e=1.98 \times 10^{-4}$	$MC_e=1.98 \times 10^{-5}$		

Como el valor de $F_{calculada}$ para el factor laboratorio se encuentra comprendido en la región de no rechazo al 95% de confianza, se puede concluir que el Método Analítico es reproducible entre los laboratorios 1 y 2. Cabe aclarar, que la demostración de Reproducibilidad se restringe a los laboratorios que hayan participado en el estudio y, que en la medida que se desee incorporar el método en otros, estos deberán participar también dentro del estudio colaborativo¹⁵.

3.4 Exactitud del Método Analítico

3.4.1 ¿Qué es la Exactitud del Método Analítico?

La **Exactitud de un Método Analítico se define como el grado de concordancia entre el valor que es aceptado, ya sea como un valor real convencional o un valor de referencia aceptado y el valor encontrado en la medición^{1,7}. De acuerdo con la FEUM⁶, es la concordancia absoluta entre el resultado obtenido con el método y la cantidad verdadera del analito en la muestra, a una cantidad fija**. Dicho en otras palabras, mientras que en la determinación de precisión se requería demostrar qué tan parecidos eran los resultados analíticos entre sí (variando o no ciertas condiciones del análisis), en la determinación de Exactitud del método se desea demostrar el grado en que los resultados analíticos obtenidos son cercanos a la cantidad (concentración) real del mensurando o analito en la muestra. Con base en lo anterior, a la Exactitud también se le denomina "veracidad" de los resultados analíticos, y está relacionada con el grado de sesgo de las determinaciones en relación con el valor real de la cantidad de analito en la muestra (mismo que se consideraría el valor promedio aceptado como referencia)².

3.4.2 ¿Por qué demostrar la Exactitud de un Método Analítico?

Una vez que, mediante la demostración de la precisión del método, se ha logrado demostrar que los resultados de múltiples determinaciones de la misma muestra analítica no varían de forma considerable entre sí, **es necesario, con la demostración de la Exactitud del método, dar certeza de que tales mediciones no se alejan de forma considerable del valor aceptado como real o verdadero del mensurando contenido en una muestra^{5, 21}**.

Explicando esta situación de una manera muy sencilla, se espera que en un Método Analítico no sólo se tenga certeza de que se mide lo que se pretende medir (Especificidad), sino que también que se mide con poca variación (precisión) y que la cantidad que se dice que se mide del analito es la que en realidad existe en la muestra (Exactitud). La Exactitud, entonces, permite demostrar de qué manera las operaciones involucradas en el Método Analítico permiten llegar a un resultado verídico de la cantidad de analito en realidad presente en la muestra. Lo anterior, cobra especial

relevancia en la medida en que un mayor número de operaciones están consideradas dentro del Método Analítico, ya que cada una de estas operaciones introducirá un término de incertidumbre en la medición, que combinación con los demás podría alejar al resultado obtenido del valor o la cantidad real del analito en la muestra. Como resultado de lo anterior, es de esperarse que, en la medida en que un Método Analítico involucra menos operaciones para la generación de un resultado, dicho resultado tienda a parecerse más al valor real y, por ende, el grado de Exactitud del método sea mayor²¹⁻²².

3.4.3 ¿Para qué tipo de métodos se lleva a cabo la demostración de Exactitud?

La demostración de Exactitud, al igual que en el caso de Linealidad y precisión, **se lleva a cabo para los métodos de análisis de tipo cuantitativo**. Esta demostración debe ser realizada también en el intervalo de concentraciones en el que se considera probable obtener un valor para la medición, que ya se había definido como intervalo de trabajo, de conformidad con lo mencionado en la Tabla 3.2.

3.4.4 ¿Cómo se determina la Exactitud de un Método Analítico?

La demostración de Exactitud del Método Analítico depende en gran medida de la aplicación y del tipo de método que se estará validando.

En la FEUM⁶ se establece la determinación de la Exactitud en virtud de si el método cuantitativo pertenece a la categoría I o II (Numeral 1.3.3 de este libro), y en la guía de ICH³ se desglosa la determinación de Exactitud en función de si el método pertenece a la categoría I y es aplicado a una materia prima o a un medicamento.

3.3.4.1 Determinación de Exactitud para un Método Analítico aplicado a la valoración de una materia prima

La forma más sencilla para demostrar la Exactitud del Método Analítico para la valoración de una materia prima, consiste en aplicar el Método Analítico a un analito de pureza conocida (que, de acuerdo con la definición, puede ser una sustancia de referencia^{1,2}), llevando a cabo un mínimo de nueve determinaciones en un mínimo de tres niveles de concentración (como ya se dijo, dentro del intervalo de trabajo). En la FEUM⁶ establece que la determinación de Exactitud deberá realizarse en una concentración del analito que represente al 100% de este al menos por sextuplicado.

Una vez realizado el procedimiento, la forma más común de determinar la Exactitud consiste en proceder al cálculo del porcentaje de recobro (Ecuación 3.16) para cada cantidad adicionada del analito, y posteriormente comparar el resultado de la media aritmética de los porcentajes de recobro con el valor aceptado para la Exactitud (que, de manera general, debería ser un recobro de 100%), de acuerdo con la Ecuación 3.26.

$$t = \frac{\bar{x} - \mu}{\frac{s}{\sqrt{n}}}$$

Ecuación 3.26

Donde:

t = valor del estadígrafo t de Student para la estimación de la media de los recobros.

\bar{x} = Media aritmética de los porcentajes de recobro obtenidos.

μ = Media poblacional aceptada como real para los porcentajes de recobro.

s = Desviación estándar de las determinaciones de porcentaje de recobro.

n = Número de observaciones utilizadas para el cálculo de t .

Para ejemplificar los cálculos de Exactitud del Método Analítico, se presentan los resultados de la Tabla 3.16 para la Validación de un Método Analítico espectrofotométrico para la valoración de un fármaco como materia prima. Se presenta el porcentaje de recobro para cada determinación.

Como puede observarse en la Tabla 3.16, los valores de porcentaje de recobro en cada una de las determinaciones del ejemplo son muy cercanos al 100%, que sería el valor aceptable de recuperación del analito a partir de la aplicación del método a muestras que lo contengan. Para tener una mayor certeza de la estimación de la cercanía, se puede aplicar la ecuación 3.26, al cálculo de la t de Student para determinar si se cumple la hipótesis nula:

$$H_0: \mu = 100$$

$$H_1: \mu \neq 100$$

Los resultados para el valor de t de Student calculada a partir de los datos de la Tabla 3.16 se muestran en la Tabla 3.17. Como puede observarse en esta tabla, en los tres niveles analizados se cumple el criterio de que la $t_{\text{calculada}}$ se encuentra dentro de la región de no rechazo, con un 95% de confianza, por lo que podría concluirse que el Método Analítico es exacto.

Tabla 3.16 Resultados de la determinación Exactitud para un método usado para la valoración de un fármaco por Espectrofotometría UV.

Concentración	Respuesta	Concentración recuperada	%R
80	0.405	79.95	99.94
	0.408	80.51	100.64
	0.412	81.26	101.58
	0.411	81.23	101.54
	0.408	80.56	100.70
	0.405	79.98	99.98
100	0.507	99.03	99.03
	0.508	99.23	99.23
	0.510	99.60	99.60
	0.513	100.27	100.27
	0.519	101.31	101.31
	0.512	99.98	99.98
120	0.613	118.88	99.07
	0.624	120.94	100.78
	0.628	121.68	101.40
	0.625	121.18	100.98
	0.619	120.11	100.09
	0.617	119.78	99.82

Una segunda alternativa que brindan diferentes referencias, establece que, **en caso de no contarse con un material de referencia adecuado, es posible demostrar la Exactitud del método por comparación de los resultados obtenidos aplicando el método en estudio con aquellos que se obtienen aplicando un segundo método que haya sido bien caracterizado y cuya Exactitud ha sido establecida²²⁻²³**. Las determinaciones se realizarán, en este caso, también en tres niveles por triplicado como mínimo, o con seis determinaciones alrededor del 100%, y las comparaciones se llevarán a cabo con los porcentajes de recobro para cada método.

Tabla 3.17 Cálculo de t de Student para la determinación de Exactitud con los datos de la Tabla 3.16.

Nivel de concentración adicionada	t _{calculada}	
80	2.49	(-2.57-2.57)
100	-0.29	
120	1.03	

A partir de lo anterior, resulta lógico pensar que, si la Exactitud del método de prueba es igual a la del método con el que se compara (de referencia), los porcentajes de recobro obtenidos deberán ser los mismos. En este orden de ideas, partiendo de la siguiente hipótesis:

H_0 : Los porcentajes de recobro de ambos métodos son iguales.

H_1 : Los porcentajes de recobro de ambos métodos son diferentes.

Si se cumple la hipótesis nula, entonces se puede expresar en los siguientes términos:

$$H_0: \mu_p = \mu_o \therefore \mu_A - \mu_o = 0$$

$$H_1: \mu_A \neq \mu_o \therefore \mu_A - \mu_o \neq 0$$

Donde:

μ_p : Promedio de la población de porcentajes de recobro para el método de prueba.

μ_o : Promedio de la población de los resultados de porcentajes de recobro para el método de referencia.

Si se expresan las hipótesis en esos términos, se puede demostrar la Exactitud llevando a cabo una inferencia para la diferencia de medias, con el uso del estadígrafo t de Student, aplicando la ecuación 3.27⁹.

$$t = \frac{\bar{y}_A - \bar{y}_O - \Delta_0}{S_p \sqrt{\frac{1}{n_A} + \frac{1}{n_O}}}$$

Ecuación 3.27

Donde:

\bar{y}_p = Promedio de los resultados de porcentaje de recobro aplicando el método de prueba.

\bar{y}_o = Promedio de los resultados de porcentaje de recobro aplicando el método de referencia.

Δ_0 = Valor de la hipótesis nula, que en este caso es de 0.

S_p = Desviación estándar ponderada de las muestras.

n_p = Número de observaciones obtenidas con el método de prueba.

n_o = Número de observaciones obtenidas con el método de referencia.

El cálculo de la desviación estándar ponderada se lleva a cabo partiendo del supuesto de que las varianzas son desconocidas, pero iguales, utilizando para ello la ecuación 3.28.

$$S_p = \sqrt{\frac{((n_p - 1)S_p^2) + ((n_o - 1)S_o^2)}{n_p + n_o - 2}}$$

Ecuación 3.28

Donde:

S_p = Desviación estándar ponderada de las muestras.

n_p = Número de observaciones obtenidas con el método de prueba.

n_o = Número de observaciones obtenidas con el método de referencia.

S_p^2 = Varianza de los resultados de porcentaje de recobro aplicando el método de prueba.

S_o^2 = Varianza de los resultados de porcentaje de recobro aplicando el método de referencia.

Una vez que se obtiene el valor de $t_{\text{calculada}}$ para la diferencia de las medias, se contrasta con la t de tablas, comúnmente con un valor de 0.05, y si el valor se sitúa dentro de la zona de no rechazo, se dice que el método presenta Exactitud.

Si la determinación de Exactitud se realiza en diferentes niveles de concentración (al menos cinco), es posible demostrar que el método es exacto aplicando para ello el ajuste de los datos de cantidad adicionada contra cantidad recuperada a un modelo lineal por mínimos cuadrados⁶. Los cálculos y el análisis de los datos podrían llevarse a cabo siguiendo las pautas establecidas en la sección 3.2.4 de este libro.

La tercera alternativa para establecer Exactitud se menciona en la guía Q2 de ICH¹. En dicho texto, se dice que la Exactitud del método puede ser inherente una vez que se han demostrado la precisión, Linealidad y Especificidad del método^{1, 23}. Esta opción, a todas luces, debería ser considerada como el último recurso, ya que **con ella en realidad no se demuestra Exactitud, ya que no proviene de mediciones reales, sino solamente, como se indica, se infiere que el método es exacto.**

3.4.4.2 Determinación de Exactitud para un Método Analítico aplicado a la valoración del contenido de un analito en un medicamento

De acuerdo con la guía Q2 de ICH¹, **para la determinación de Exactitud del Método Analítico para un método en el que se desea cuantificar un analito dentro de un medicamento es posible recurrir a cuatro métodos**²²⁻²³:

- a. Aplicar el Método Analítico a mezclas artificiales de los componentes del medicamento a las cuales se les han adicionado cantidades conocidas del analito. Este método se denomina en análisis farmacéutico, de manera común, "**método del placebo cargado**", y
- b. En los casos donde no es posible obtener muestras de todos los componentes del medicamento, será aceptable ya sea adicionar cantidades conocidas del analito al producto (**método del estándar adicionado**), o
- c. Comparar los resultados con aquellos obtenidos a partir de un segundo procedimiento analítico bien caracterizado para el cual se ha demostrado o definido la Exactitud.
- d. Al igual que en la sección anterior, la cuarta alternativa para establecer Exactitud que se menciona en la guía Q2 de ICH¹ es aquella en la que se dice que la Exactitud del método puede ser inferida una vez que se han demostrado la precisión, Linealidad y Especificidad del método. La limitación de esta alternativa ya fue señalada en la sección anterior.

Debe tenerse en cuenta que la preparación de placebos cargados o estándares adicionados siempre representa un reto con relación a la incorporación real del fármaco en la muestra. Por ejemplo, si el placebo cargado se prepara mezclando polvos de todos los componentes, incluido el analito, puede existir un cierto grado de confianza de que la extracción a partir de los polvos será homogénea y apegada a lo que se espera de una "muestra real"; sin embargo, si la preparación del placebo cargado implica que una mezcla de polvos del placebo sea, por ejemplo, "rociada" con una solución del analito para cargarlo, se corre el riesgo de que esta "muestra artificial" difiera en su comportamiento durante la extracción del analito con respecto a una muestra real. En síntesis, deberá de cuidarse, en la medida de lo posible, que la preparación de los placebos cargados o los estándares adicionados sea cercana a la preparación de una muestra "real".

En cualquiera de los casos, los resultados que se obtendrán serán los porcentajes de recobro, y el análisis matemático para la demostración de Exactitud será el mismo que ya se señaló en la sección 3.4.4.1.

3.4.4.3 Determinación de Exactitud para un Método Analítico aplicado a la cuantificación de impurezas

Para la determinación de la Exactitud de un método que se utilizará para la cuantificación de impurezas, es recomendado el que se adicione a las muestras a analizar cantidades conocidas y fijas de la impureza a determinar (normalmente en un nivel del 100% de la concentración esperada de impurezas) y, que de igual forma que en los casos anteriores, se analicen los porcentajes de recobro de la impureza a partir de la muestra y se contraste con el estadígrafo de prueba de la Ecuación 3.26. Una segunda alternativa, es también la comparación de los porcentajes de recobro de impurezas obtenidos con el método de prueba con aquellos que se obtienen con un procedimiento independiente^{1, 6, 7}.

3.5 Límite de Detección del Método Analítico

3.5.1 ¿Qué es el Límite de Detección del Método Analítico?

El Límite de Detección de un Método Analítico se define como la menor cantidad del analito en una muestra que puede ser detectada pero no necesariamente cuantificada como un valor exacto¹. En términos de incertidumbre de la medición, se menciona que la determinación del Límite de Detección **tiene como fin solamente establecer el confín más bajo del intervalo de operación práctica del método³.** De acuerdo con la IUPAC^{5, 22}, el Límite de Detección se define como la cantidad real de analito en la muestra que lleva a concluir con una alta probabilidad que éste está presente en la muestra, siguiendo criterios específicos de decisión. Este representa una característica de desempeño que debe determinarse cuando un Método Analítico se aplica como prueba límite.

3.5.2 ¿Por qué demostrar el Límite de Detección de un Método Analítico?

Conforme la medición de un determinado analito se acerca a niveles bajos de concentración, se incrementa el efecto de diferentes variables en la respuesta analítica obtenida, dentro de las que se pueden considerar las siguientes^{3, 7}:

- La inestabilidad de la línea base del instrumento.
- La influencia de los blancos analíticos.
- Pérdida del analito durante los procesos de extracción o limpieza de la muestra.

Por lo anterior, conforme nos acercamos a niveles bajos del intervalo de trabajo aceptable para el método, la incertidumbre de las mediciones tiende a incrementarse, representando una fracción sustancial del resultado analítico de inicio y, conforme se disminuye aún más la concentración, la magnitud de la incertidumbre asociada es tal que puede incluir en su intervalo al valor de cero, de tal forma que representa, en términos reales, el punto final más bajo del intervalo práctico de trabajo. Lo anterior, implicaría que **la aplicación más importante del Límite de Cuantificación es el establecimiento de un valor numérico de concentraciones a partir de las cuales el desempeño del método resulta insuficiente para una medición aceptable, por lo que no debería tenerse confianza en mediciones realizadas de manera cuantitativa en esa región del intervalo de trabajo**³.

3.5.3 ¿Para qué tipo de métodos se lleva a cabo la demostración de Límite de Detección?

En la mayoría de las referencias consultadas existe el consenso claro, a partir de la definición práctica del Límite de Detección, de que **la demostración de esta característica de desempeño debe realizarse para Métodos Analíticos cuya aplicación implique la determinación de niveles bajos del analito, sin necesariamente buscar su cuantificación, es decir, en pruebas de impurezas límite**^{6, 24}.

3.5.4 ¿Cómo se determina el Límite de Detección de un Método Analítico?

Se han propuesto diferentes alternativas para la determinación del Límite de Detección, las cuales dependen primordialmente del tipo de técnica analítica (instrumental o no instrumental) y de la aplicación deseada del método¹⁻⁷.

El alcance más sencillo para la determinación del Límite de Detección, empleado principalmente (pero no únicamente) para Métodos Analíticos no instrumentales, consiste en el análisis de muestras con concentraciones conocidas del analito, estableciendo en orden de concentración decreciente en cuál de ellas se tiene el nivel mínimo en el cual el analito puede ser detectado de manera "confiable". Este método, **se denomina como el método de evaluación visual**, y se puede ejemplificar con la figura 3.7, donde se muestran tres cromatogramas de concentración descendente de glibenclamida²⁵ en los cuales, a juicio del analista, el Límite de Detección podría ser aquella concentración a partir de la cual se obtiene el cromatograma B o el C, es decir, de manera arbitraria, se puede definir un valor para el Límite de Detección, que no necesariamente implicaría una lógica que permita cubrir el concepto de la cota del intervalo de trabajo aceptable. Esa arbitrariedad, es la principal limitante de este método para determinar Límite de Detección.

Una aplicación muy sencilla de este método para la determinación del Límite de Detección sería aquella en donde el método tiene como objetivo determinar una impureza en un valor límite, y por lo tanto la determinación del Límite de Detección sería aquella en donde únicamente se corroboraría que el método permite efectivamente determinar la presencia del analito experimentalmente en las condiciones establecidas. Como ejemplo, si se menciona en un protocolo para la determinación de impurezas de conformidad con las guías Q3A a Q3C²⁶⁻²⁸, que el umbral de detección aceptado es de 0.1% (Tabla 3.18), entonces las determinaciones de la última columna de dicha tabla permitirían fundamentar que el Límite de Detección del método es efectivamente el establecido en el protocolo.

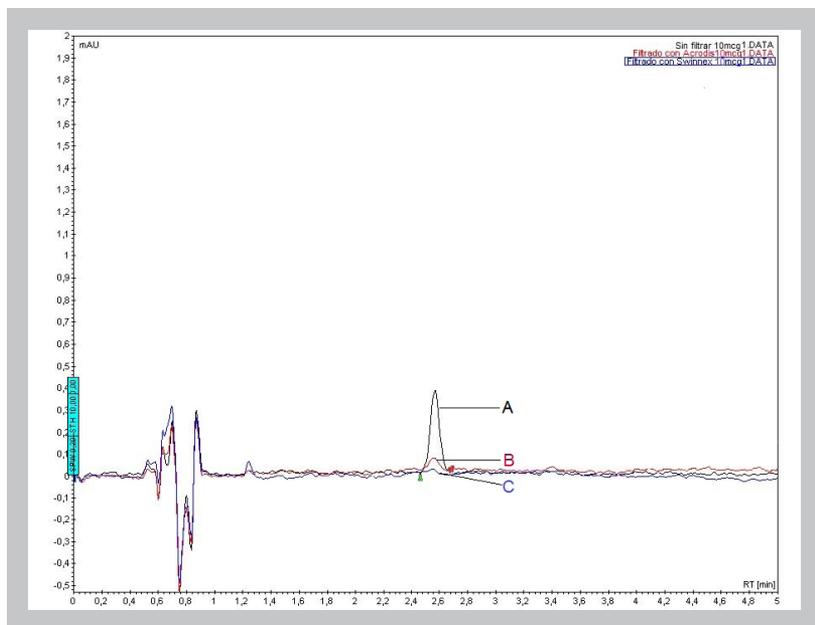


Figura 3.7 Cromatogramas de glibenclamida en concentraciones de 1 (A), 0.1 (B) y 0.05 C $\mu\text{g}/\text{mL}$ ²⁵.

Tabla 3.18 Determinación de impurezas en un fármaco nuevo²⁶.

Dosis máxima diaria de la impureza	Umbral de reporte	Umbral de identificación	Umbral de cuantificación	Valores obtenidos de impureza en la prueba límite (mg) que permiten establecer el Límite de Detección
≤ 2 mg	0.05%	0.1% o 1.0 mg/día (cualquiera que sea el más bajo)	0.15 o 1.0 mg/día	≥ 0.200 mg
>2 mg	0.03%	0.05%	0.05%	≥ 0.100 mg

El segundo método recomendado para la determinación del Límite de Detección es aquel fundamentado en la relación señal-ruido de la respuesta²⁴. Resulta claro que solamente puede ser aplicado para aquellos Métodos Analíticos instrumentales donde es posible obtener una línea base que derive en el cálculo de la relación señal a ruido. La determinación se realiza comparando las señales medidas a partir de muestras que contienen al analito en concentraciones bajas conocidas con las mediciones del ruido obtenidas a partir de blancos analíticos. Se ha establecido de manera convencional que el Límite de Detección será aquel donde se obtenga al menos una relación señal-ruido de (2:1), aunque en algunas referencias se prefiere una relación (3:1), ya que con ese valor la posibilidad de que el intervalo de concentraciones del analito en el Límite de Detección contenga al valor de cero se reduce^{1, 3, 22}. En la Tabla 3.19, se muestra el cálculo de la relación señal-ruido para los cromatogramas de la Figura 3.7. Como puede observarse en esta Tabla, la relación señal a ruido mayor a 2.0 se cumple para el cromatograma B, no así para el C, por lo que el Límite de Detección, con base en este criterio, sería de 0.1 mg/mL.

Tabla 3.19 Relación señal-ruído para los cromatogramas de la Figura 3.7.

Cromatograma	ABC de la señal de glibenclamida (mAu*seg)	ABC del ruido (mAu*seg)	Relación señal:ruido
A	101.3	9.26	10.93:1.00
B	20.19		2.18:1.00
C	6.73		0.73:1.00

Una tercera forma de aproximación a la determinación del valor del Límite de Detección es la que se fundamenta en la relación que existe entre la desviación estándar de la respuesta analítica y la pendiente de la curva concentración vs respuesta^{1, 6, 7, 22}. El Límite de Detección, tendría un valor establecido de acuerdo con la Ecuación 3.29:

$$LD = \frac{3.3S}{b}$$

Ecuación 3.29

Donde:

LD = Límite de detección del método.

S = Desviación estándar de la respuesta.

b = Pendiente de la curva concentración vs respuesta.

Para el caso de la pendiente, se utilizará la de la curva concentración vs respuesta. La desviación estándar puede calcularse en dos distintas formas:

- a) Construyendo una curva concentración vs respuesta utilizando muestras que contengan al analito en el intervalo de concentraciones del Límite de Detección. La desviación estándar residual de la curva de regresión o la desviación estándar de la ordenada al origen pueden ser utilizadas como desviación estándar de la respuesta. En este método, toda vez que las concentraciones a determinar son bajas, puede encontrarse que los niveles más altos de la curva tengan una mayor influencia en los valores de la desviación estándar (es decir, que se presente heterocedasticidad en la curva), por lo que se requiere un mayor número de niveles en la curva que durante el cálculo de Linealidad (al menos ocho niveles)¹⁻⁶.

En la Tabla 3.20 se presentan los datos de la curva concentración vs respuesta para un analito cuantificado por CLAR en fase reversa, con detección UV, en concentraciones cercanas a su Límite de Detección.

Tabla 3.20 Valores de concentración vs respuesta para la determinación de Límite de Detección y Límite de Cuantificación de un Método Analítico por CLAR en fase reversa.

Concentración (ng/mL)	Respuesta 1 (mAu*seg)	Respuesta 2 (mAu*seg)	Respuesta 3 (mAu*seg)
1000	101.3	102.3	101.9
800	82.2	82.1	83.2
700	70.8	70.9	71.4
600	63.4	60.9	63.3
500	49.5	47.2	47.1
400	42.2	39.1	39.1
300	29.3	28.2	28.3
200	23.9	21.9	22.2
100	8.2	8.5	8.3

Con los datos de la Tabla 3.20, se calcularon los resultados de la Tabla 3.21:

Tabla 3.21 Resultados de la regresión lineal por mínimos cuadrados de la Tabla 3.20.

Ordenada al origen	-1.01 mAu*seg
Pendiente	0.1031 mAu*seg*mL/ng
Coefficiente de correlación	0.9980
Varianza de los valores de x	79487.17
Varianza de los valores de y	849.75
Número de observaciones	27
Varianza residual de la regresión	5.029
Desviación estándar residual de la regresión	2.242

Con el valor de la pendiente y de la desviación estándar residual de la regresión, se calcula el Límite de Detección:

$$LD = \frac{3.3S}{b} = 3.3 \left(\frac{2.242}{0.1031} \right) = 71.76 \text{ ng/mL}$$

- b) Analizando una serie de blancos analíticos y calculando la desviación estándar de dichas respuestas. En este caso, resulta claro que este método sólo puede aplicarse donde se llega a obtener una respuesta a partir de los blancos analíticos^{1, 3, 7}.

De ambos métodos, el que resulta ser más preciso para el cálculo de Límite de Detección es el de la desviación estándar de la curva de regresión.

3.6 Límite de Cuantificación del Método Analítico

3.6.1 ¿Qué es el Límite de Cuantificación del Método Analítico?

El Límite de Cuantificación de un Método Analítico se define como la menor cantidad del analito en una muestra que puede ser determinada cuantitativamente con una adecuada precisión y Exactitud¹. En términos de incertidumbre de la medición, se menciona que la determinación del Límite de Cuantificación **tiene como fin el establecer el mínimo valor de concentración en el que una medición aplicando el método establecido será confiable cuantitativamente^{3, 5}.**

3.6.2 ¿Por qué demostrar el Límite de Cuantificación de un Método Analítico?

La variabilidad que puede esperarse de un Método Analítico aplicado a la cuantificación de un compuesto en concentraciones bajas es mayor que aquella que puede esperarse para un método cuyo objetivo es la valoración del contenido de activo en un polvo o en un medicamento^{3, 6}. El efecto del incremento de la variabilidad al disminuir las concentraciones fue observado por Horwitz cuando conjuntó los resultados de una serie de estudios colaborativos en los que se emplearon diferentes técnicas analíticas en diversos intervalos de concentración de trabajo para analitos diversos²⁹. La relación que observó Horwitz está representada por una gráfica clásica en análisis farmacéutico, denominada "trompeta de Horwitz" (Figura 3.8). A partir de ella, es posible concluir que sin importar la naturaleza del analito o del material de prueba, el principio del incremento de la variabilidad del método en función de la disminución de la concentración del analito en la muestra es una constante.

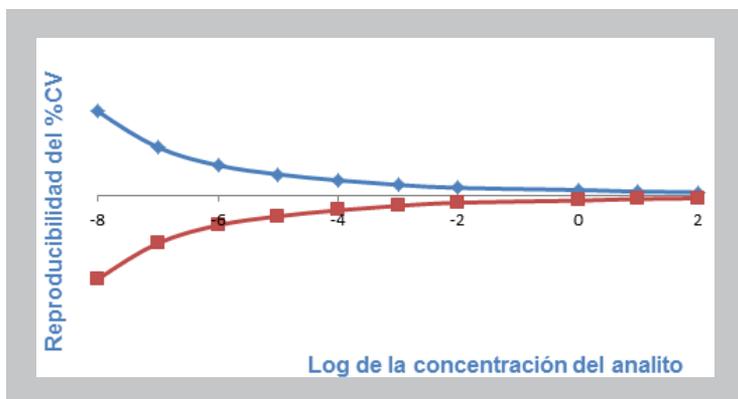


Figura 3.8 Ejemplo de la "trompeta de Horwitz"²⁹.

Por lo anterior, y siguiendo el mismo razonamiento que para el Límite de Detección, **conforme nos acercamos a niveles bajos del intervalo de trabajo aceptable para el método, la incertidumbre de las mediciones tiende a incrementarse, representando una fracción sustancial del resultado analítico de inicio, por lo que resulta indispensable, a partir de la determinación del Límite de Cuantificación, conocer el menor nivel de concentración en el cual es posible concluir que se mantiene la capacidad cuantitativa del método, es decir, la concentración más baja en la cual las determinaciones cuantitativas son aún confiables**^{1, 6, 29}.

3.6.3 ¿Para qué tipo de métodos se lleva a cabo la demostración de Límite de Cuantificación?

En la FEUM, se establece que su utilización se limita únicamente a los métodos Categoría II⁶. Sin embargo, esto implicaría la necesidad de que un método para la determinación de impurezas como límite fuera cuantitativo, lo que no necesariamente es correcto. Por lo anterior, puede establecerse que **la demostración de esta característica de desempeño debe realizarse para Métodos Analíticos cuantitativos de rutina cuya aplicación implique la determinación de concentraciones bajas del analito**, es decir, en métodos tales como las pruebas de impurezas cuantitativas^{1, 6, 7}.

3.6.4 ¿Cómo se determina el Límite de Cuantificación de un Método Analítico?

Se han propuesto diferentes alternativas para la determinación del Límite de Cuantificación, las cuales dependen primordialmente del tipo de técnica analítica (instrumental o no instrumental) y de la aplicación deseada del método (cuantificación de impurezas o pruebas límite de impurezas)^{1, 7}.

El alcance más sencillo para la determinación del Límite de Cuantificación, empleado principalmente (pero no únicamente) para Métodos Analíticos no instrumentales, consiste en el análisis de muestras con concentraciones conocidas del analito, estableciendo en orden de concentración decreciente en cuál de ellas se tiene el nivel mínimo en el cual el analito puede ser detectado de manera "confiable". Este método, se denomina como el método de evaluación visual, y se puede ejemplificar también con la figura 3.8, donde se muestran tres cromatogramas de concentración descendente de glibenclamida²⁵ en los cuales, a juicio del analista, el Límite de Cuantificación podría ser aquella concentración a partir de la cual se obtiene el cromatograma A o el B, es decir, de manera arbitraria, se puede definir un valor para el Límite de Cuantificación, que no necesariamente implicaría una lógica que permita cubrir el concepto de la cota del intervalo de trabajo aceptable. Esa arbitrariedad, es la principal limitante de este método para determinar Límite de Cuantificación.

El segundo método recomendado para la determinación del Límite de Cuantificación es aquel fundamentado en la relación señal-ruido de la respuesta. Resulta claro que este método, al igual que ocurre con la determinación del Límite de Detección, solamente puede ser aplicado para aquellos Métodos Analíticos instrumentales donde es posible obtener una línea base que derive en el cálculo de la relación señal a ruido. La determinación se realiza comparando las señales medidas a partir de muestras que contienen al analito en concentraciones bajas conocidas con las mediciones del ruido obtenidas a partir de blancos analíticos. Se ha establecido de manera convencional que el Límite de Cuantificación será aquel donde se obtenga al menos una relación señal-ruido de (10:1)^{1- 3, 30}. En la Tabla 3.19, se muestra el cálculo de la relación señal-ruido para los cromatogramas de la Figura 3.7. Como puede observarse en esta Tabla, la relación señal a ruido mayor a 10 se cumple para el cromatograma A, no así para los otros, por lo que el Límite de Cuantificación, con base en este criterio, sería de 1.0 mg/mL.

Una tercera forma de aproximación a la determinación del valor del Límite de Cuantificación es la que se fundamenta en la relación que existe entre la desviación estándar de la respuesta analítica y la pendiente de la curva concentración vs respuesta^{30, 31}. El Límite de Cuantificación, tendría un valor establecido de acuerdo con la Ecuación 3.30:

$$LC = \frac{10S}{b}$$

Ecuación 3.30

Donde:

LC = Límite de cuantificación del método.

S = Desviación estándar de la respuesta.

b = Pendiente de la curva concentración vs respuesta.

Para el caso de la pendiente, se utilizará la de la curva concentración vs respuesta. La desviación estándar puede calcularse en las dos formas que ya se mencionaron para el Límite de Detección:

- a) Construyendo una curva concentración vs respuesta utilizando muestras que contengan al analito en el intervalo de concentraciones del Límite de Cuantificación. La desviación estándar residual de la curva de regresión ($S_{y/x}$, que se calcula a partir de la ecuación 3.12) o la desviación estándar de la ordenada al origen pueden ser utilizadas como desviación estándar de la respuesta¹⁻⁷.

Si se utilizan de nuevo los resultados obtenidos (Tabla 3.21) para los datos de la Tabla 3.20, se puede calcular el valor del Límite de Cuantificación:

$$LC = \frac{10S}{b} = 10 \left(\frac{2.242}{0.1031} \right) = 217.45 \text{ ng/mL}$$

- b) Analizando una serie de blancos analíticos y calculando la desviación estándar de dichas respuestas. En este caso, resulta claro que este método sólo puede aplicarse donde se llega a obtener una respuesta a partir de los blancos analíticos^{1-3,7}.

De ambos métodos, el que resulta ser más preciso para el cálculo de Límite de Cuantificación es también el de la desviación estándar de la curva de regresión.

3.7 Robustez del Método Analítico

3.7.1 ¿Qué es la Robustez del Método Analítico?

La Robustez se refiere a la capacidad del Método Analítico de permanecer inalterado en cuanto a sus resultados una vez que se presentan variaciones pequeñas, pero deliberadas, en sus condiciones normales de operación^{4, 6, 7}. Es sumamente importante aclarar, que por condiciones normales de operación nos referimos a factores inherentes a la operación del método, y que durante su operación normal pueden variar de manera común (temperaturas, valores de pH, velocidades de flujo de fase móvil, entre otros). No se consideran en esta categoría los factores investigados durante los estudios de precisión mismos que, por definición, son externos al método (analistas, días de trabajo, laboratorios, equipos).

3.7.2 ¿Por qué demostrar la Robustez de un Método Analítico?

La demostración de la Robustez del método es necesaria como una medida importante de la confiabilidad de los resultados que se obtienen con el mismo. Puede aseverarse lo anterior, porque **durante la operación cotidiana en el laboratorio analítico, habrá procesos específicos que forman parte de un determinado procedimiento (método) analítico que, si no se controlan con suficiente cuidado, potencialmente tendrán un efecto sobre el desempeño del mismo, dando lugar a la obtención de resultados analíticos erróneos³².**

Para definir los factores que han de estudiarse durante un estudio de Robustez, es necesario el conocimiento del procedimiento analítico de manera completa, de sus fundamentos y, por lo tanto, de aquellos factores que podrían considerarse como críticos en su desempeño. De manera enunciativa, más no limitativa, en la Tabla 3,22 se mencionan algunos de los factores que podrían considerarse críticos en el desempeño cotidiano del Método Analítico y que, a su vez, podrían formar parte de un estudio de Robustez, de acuerdo con algunas técnicas empleadas de manera común en el laboratorio de análisis farmacéutico³²⁻³⁴.

Resulta necesario realizar una aclaración con respecto a otro parámetro que normalmente tiende a confundirse con el de Robustez, que es el de Tolerancia. De acuerdo con la FEUM, la Tolerancia del Método Analítico es el grado de Reproducibilidad de los resultados de prueba obtenidos del análisis de una misma muestra cuando se realizan las mediciones bajo diferentes condiciones de análisis, tales como laboratorios, marcas de reactivos, entre otros. Apegados a dicha definición, la Tolerancia representaría primordialmente lo que la guía Q2 de la ICH define como Reproducibilidad del Método Analítico, de manera conjunta con lo que en la misma guía se denomina Robustez, lo que genera confusión. En una definición más clara, **la Tolerancia puede definirse como la habilidad para reproducir el Método Analítico en diferentes laboratorios o bajo circunstancias diferentes sin que ocurran por ello diferencias inesperadas entre los resultados obtenidos**³⁵⁻³⁷.

Tabla 3.22 Factores que podrían considerarse críticos durante un estudio de Robustez.

Técnica analítica	Factores
Espectroscopia	Disolvente pH de la solución Temperatura Longitud de onda
Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR)	% de agua en la fase móvil % de modificador orgánico en la fase móvil pH de la fase móvil Temperatura Velocidad de flujo Fuerza iónica del amortiguador Concentración de aditivos en la fase móvil Exactitud en el volumen de inyección Tiempo de equilibrio del sistema Edad de la columna Condiciones de la detección
Volumetría	Sistema de detección del punto final empleado Temperatura Concentración de reactantes Calidad de los estándares
Cromatografía de gases	Temperatura de los diferentes componentes Velocidad de flujo del gas Velocidad de calentamiento Presión de la columna Preparación de la muestra

3.7.3 ¿Para qué tipo de métodos se lleva a cabo la demostración de Robustez?

La demostración de esta característica de desempeño debe realizarse para todos los Métodos Analíticos, bajo el supuesto de que el mejor control de los factores críticos del procedimiento analítico permitirá mantener la confiabilidad de los resultados analíticos durante el periodo de uso del método. Debe tomarse siempre en cuenta el tipo de técnica analítica a emplear y el equipo, materiales e instrumentos asociados a la misma^{1, 6, 7}.

En ocasiones, la determinación de Robustez se conjuga (de ser necesario) con la de Tolerancia. La demostración de la Tolerancia del Método Analítico no es un parámetro obligatorio, y mucho menos que se requiera de manera común durante un estudio de Validación pero, al igual que con la Robustez, **puede representar una medida importante de la confiabilidad de los resultados que se obtienen con el Método Analítico cuando este es transferido entre laboratorios, o cuando se varían condiciones que no son intrínsecas a la operación del método, pero que sí pueden llegar a afectar sus resultados, como serían marcas de reactivos, proveedores o tipos de columnas, entre otros**³⁴⁻³⁵.

3.7.4 ¿Cómo se determina la Robustez de un Método Analítico?

De manera general, la determinación de Robustez de un Método Analítico puede consistir de dos etapas, la primera inicia desde la fase de desarrollo del mismo, y la segunda concluye durante el estudio de la Validación del método.

3.7.4.1 Determinación de Robustez durante la etapa de desarrollo del Método Analítico

Con relación a la determinación de Robustez del método durante la etapa de desarrollo del mismo, esta depende de la estrategia seguida para conocer las condiciones más adecuadas para cada uno de los procesos involucrados en el procedimiento analítico general. **Partimos del hecho que, durante la etapa de desarrollo del método, es cuando se conocen los factores críticos que pueden afectar el desempeño**

cotidiano del mismo, ya que son los que normalmente se modifican durante la implementación, para arribar al mejor resultado analítico.

Si se sigue un diseño de experimentos para obtener las condiciones de análisis generales o para la optimización del mismo método, es posible conocer de manera relativamente sencilla los factores críticos del Método Analítico en particular, y tenerlos en consideración como parte de la información del protocolo de Validación del método para, si es necesario, comprobar de nueva cuenta el grado en que pueden o no modificar la respuesta analítica. A pesar de que una explicación minuciosa de la herramienta de diseño de experimentos escapa a los alcances de este libro, como ejemplo de lo anterior, se han realizado estudios de desarrollo de Métodos Analíticos utilizando diseño de experimentos para un método por CLAR para la valoración de un fármaco como materia prima. El diseño se muestra en la Tabla 3.23. Al analizar los datos del diseño mediante el programa Statgraphics Centurion, se obtuvo el Diagrama de Pareto estandarizado³⁸ que se muestra en la Figura 3.9, donde es posible observar que el factor crítico en la variable de respuesta (tiempo de retención) para este método es la velocidad de flujo, por lo que el Método Analítico podría no ser robusto (es decir, no mantenerse inalterado en sus resultados) ante variaciones en las condiciones de flujo de la fase móvil.

Tabla 3.23 Diseño de experimentos para el desarrollo de un Método Analítico por CLAR para la valoración de un fármaco como materia prima.

Factores experimentales			Variable de respuesta
Velocidad de flujo (mL/min)	% de Metanol	pH	
0.50	40	4.0	Tiempo de retención
0.75	45	4.5	
1.00	50	5.0	

Cabe aclarar que, si durante el desarrollo del Método Analítico no se siguió una estrategia ordenada para conocer las variables que afectan a la respuesta analítica deseada, será muy difícil tener información acerca de los factores que afectan la Robustez del método.

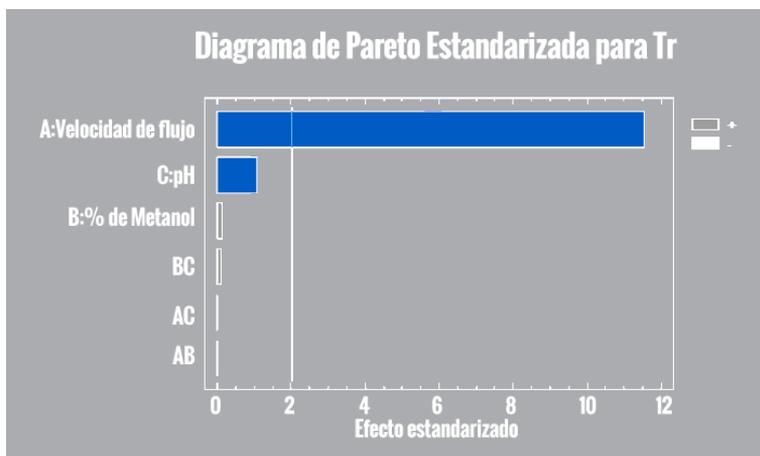


Figura 3.9 Diagrama de Pareto estandarizado para el diseño de experimentos mostrado en la Tabla 3.23.

3.7.4.2 Determinación de Robustez durante la etapa de Validación del Método Analítico

Durante la etapa de Validación del Método Analítico, se evaluará formalmente la Robustez considerando los factores que se sabe son críticos para el desempeño del método. **El estudio de Robustez implica variar de manera deliberada, en el intervalo de niveles esperados, los factores que se consideran críticos para la obtención de los resultados analíticos, generar dichos resultados y analizar si las variaciones presentan o no un impacto significativo en la respuesta.**

Un inconveniente de este tipo de estudios radica en que si se sabe que son varios los factores que pueden ser críticos en el desempeño del método, y además deben realizarse, como la definición lo establece, variaciones pequeñas pero deliberadas en los niveles de dichos factores para conocer si se presenta Robustez en el método, el estudio de cada factor por separado haría casi imposible el conducir este tipo de experimentos. Se recomienda que, si se analizan pocos factores a la vez, estos sean comprobados por separado, determinando si la variación esperada de la magnitud de tales factores puede influir en realidad en los resultados analíticos. Por ejemplo, si en un Método Analítico por Espectrofotometría UV se supiera que los únicos factores críticos que tienen potencial de producir variaciones en la respuesta al variar la magnitud del factor son los que se presentan en la Tabla 3.24:

Tabla 3.24 Factores a considerar en un estudio de Robustez de un Método Analítico por Espectrofotometría UV.

Factor	Nivel del factor en la operación normal del método	Niveles extremos que se espera pueda tomar el factor en las condiciones normales de operación	
		Bajo (-)	Alto (+)
A: Longitud de onda de la lectura	254	252	256
B: pH del amortiguador	7.0	6.8	7.2

El estudio de Robustez podría consistir únicamente en analizar muestras variando las condiciones descritas en la Tabla 3.24, y comparando la medida en que sus resultados difieren del resultado en condiciones de trabajo normales. Este análisis, podría realizarse mediante la comparación de la diferencia de las medias de las muestras que ya se ha descrito anteriormente, y que se presenta para comodidad del lector de nueva cuenta en la ecuación 3.31^{6, 11}:

$$t = \frac{\bar{y}_F - \bar{y}_P - \Delta_0}{S_p \sqrt{\frac{1}{n_F} + \frac{1}{n_0}}}$$

Ecuación 3.31

Donde:

\bar{y}_F = Promedio de los resultados de muestras analizadas variando un nivel del factor.

\bar{y}_0 = Promedio de los resultados de muestras analizadas en las condiciones originales.

Δ_0 = Valor de la hipótesis nula, que en este caso es de 0.

S_p = Desviación estándar ponderada de las muestras.

n_F = número de observaciones para las muestras analizadas variando el nivel del factor.

n_0 = número de observaciones para las muestras analizadas en las condiciones originales.

El cálculo de la desviación estándar ponderada se lleva a cabo partiendo del supuesto de que las varianzas son desconocidas, pero iguales, utilizando para ello la ecuación 3.32.

$$S_p = \sqrt{\left[\frac{((n_F - 1)S_F^2) + ((n_0 - 1)S_0^2)}{n_F + n_0 - 2} \right]}$$

Ecuación 3.32

Donde:

S_p = Desviación estándar ponderada de las muestras.

n_F = Número de observaciones para las muestras analizadas variando el nivel del factor.

n_o = Número de observaciones para las muestras analizadas en condiciones originales.

S_F^2 = Varianza de los resultados de las muestras analizadas variando el nivel del factor.

S_o^2 = Varianza de los resultados de las muestras analizadas en las condiciones originales.

La hipótesis nula que se desea comprobar en todos los casos es:

H_o : Los resultados analíticos promedio obtenidos de las muestras en las que se modificó el nivel del factor no difieren de aquellos obtenidos con muestras analizadas en condiciones originales.

Si se cumple la hipótesis nula, entonces se puede expresar en los siguientes términos:

$$H_o: \mu_A = \mu_o \therefore \mu_A - \mu_o = 0$$

$$H_1: \mu_A \neq \mu_o \therefore \mu_A - \mu_o \neq 0$$

Donde:

μ_A : Promedio de la población de resultados de muestras analizadas variando el nivel del factor.

μ_o : Promedio de la población de los resultados de muestras analizadas en condiciones originales.

Ahora bien, si en un Método Analítico por CLAR se tuvieran como factores críticos todos los que se mencionaron en el apartado correspondiente de la Tabla 3.22, se tendrían que analizar 10 factores, en tres niveles cada uno de ellos, lo que daría como resultado realizar al menos 30 experimentos

con 20 diferentes comparaciones estadísticas, algo que resulta impráctico. A partir de lo anterior, **cuando el número de factores a analizar en el estudio de Robustez es grande, resulta común recurrir a diseños de experimentos de cribado, tales como el de Packett-Burman³⁹ o como los factoriales fraccionados, para disminuir de manera significativa el número de corridas analíticas y así obtener una estimación más adecuada de la Robustez del método considerando todos los factores involucrados.**

En el diseño de tipo Plackett-Burman el número de experimentos (n) es siempre un múltiplo de 4. El número de factores (f) que pueden estudiarse en este tipo de diseños es n-1. Los diseños utilizados de manera común tienen una n=8 o n=12, lo que permite analizar a la vez 7 u 11 factores³⁹. Como ejemplo para el desarrollo de este tipo de diseños experimentales, se presenta en la Tabla 3.25 una serie de factores a considerar, con sus respectivos niveles a analizar, para un Método Analítico por CLAR para cuantificar un fármaco como materia prima (valoración)^{6, 7}.

Para el ejemplo de la Tabla 3.25, se tienen 8 factores, y por lo tanto se utilizará un diseño con n=12 experimentos. Como se podía tener un máximo de 11 (n-1) factores, quedan 3 sin definir, a los que se les denomina factores dummy, falsos o imaginarios, que son utilizados para estimar el error experimental. Las corridas experimentales a realizar son las que se definen en la Tabla 3.26; para la construcción de este tipo de tablas, es común valerse de un programa estadístico que permita aleatorizar los experimentos a realizar, para evitar efectos de acarreamiento o tiempo en algunos de ellos. Cabe aclarar, que en estos diseños, no se utilizan comúnmente los niveles normales de operación de los factores, sino niveles bajo (-, Tabla 3.25) y alto (+, Tabla 3.25) que se espera pueda tomar cada factor en las condiciones de operación del método³⁹.

Tabla 3.25 Factores a considerar en un estudio de Robustez de un Método Analítico por CLAR.

Factor	Nivel del factor en la operación normal del método	Niveles extremos que se espera pueda tomar el factor en las condiciones normales de operación	
		Bajo (-)	Alto (+)
A: Velocidad de flujo de la fase móvil (mL/min)	1.5	1.4	1.6
B: pH del amortiguador	7.0	6.8	7.2
C: Temperatura de la columna	22	20	24
D: % de amortiguador en la fase móvil	65	63	67
E: % de modificador orgánico en la fase móvil	35	37	33
F: Concentración del amortiguador (mM)	25	23	27
G: Longitud de onda de la detección (nm)	254	250	258
H: Concentración del par iónico (mM)	1	0.9	1.1

Tabla 3.26 Diseño Plackett-Burman para examinar 11 factores en 12 experimentos, a partir de los datos de la Tabla 3.25.

Experimento	Factores										
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
1	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-
2	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+
3	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-
4	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-
5	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-
6	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+
7	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+
8	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+
9	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-
10	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+
11	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

La tabla 3.26 permite definir las 12 corridas experimentales a realizar, y a partir de ellas se obtienen los resultados de cada n-ésimo experimento (y_n), mismos que permiten obtener el contraste (C_f) para cada factor (f), de acuerdo con las ecuaciones 3.33 a 3.43.

$$C_A = y_1 - y_2 + y_3 - y_4 - y_5 - y_6 + y_7 + y_8 + y_9 - y_{10} + y_{11} - y_{12} \quad \text{Ecuación 3.33}$$

$$C_B = y_1 + y_2 - y_3 + y_4 - y_5 - y_6 - y_7 + y_8 + y_9 + y_{10} - y_{11} - y_{12} \quad \text{Ecuación 3.34}$$

$$C_C = y_1 + y_2 + y_3 - y_4 + y_5 - y_6 - y_7 - y_8 + y_9 + y_{10} + y_{11} - y_{12} \quad \text{Ecuación 3.35}$$

$$C_D = y_1 - y_2 + y_3 + y_4 - y_5 + y_6 - y_7 - y_8 - y_9 + y_{10} + y_{11} - y_{12} \quad \text{Ecuación 3.36}$$

$$C_E = y_1 + y_2 - y_3 + y_4 + y_5 - y_6 + y_7 - y_8 - y_9 - y_{10} + y_{11} - y_{12} \quad \text{Ecuación 3.37}$$

$$C_F = y_1 + y_2 + y_3 - y_4 + y_5 + y_6 - y_7 + y_8 - y_9 - y_{10} - y_{11} - y_{12} \quad \text{Ecuación 3.38}$$

$$C_G = y_1 + y_2 + y_3 + y_4 - y_5 + y_6 + y_7 - y_8 + y_9 - y_{10} - y_{11} - y_{12} \quad \text{Ecuación 3.39}$$

$$C_H = -y_1 - y_2 + y_3 + y_4 + y_5 - y_6 + y_7 + y_8 - y_9 + y_{10} - y_{11} - y_{12} \quad \text{Ecuación 3.40}$$

$$C_I = -y_1 - y_2 - y_3 + y_4 + y_5 + y_6 - y_7 + y_8 + y_9 - y_{10} + y_{11} - y_{12} \quad \text{Ecuación 3.41}$$

$$C_J = y_1 - y_2 - y_3 - y_4 + y_5 + y_6 + y_7 - y_8 + y_9 + y_{10} + y_{11} - y_{12} \quad \text{Ecuación 3.42}$$

$$C_K = -y_1 + y_2 - y_3 - y_4 - y_5 + y_6 + y_7 + y_8 - y_9 + y_{10} + y_{11} - y_{12} \quad \text{Ecuación 3.43}$$

Para ejemplificar el cálculo de los contrastes para cada factor, en la Tabla 3.27 se presentan resultados hipotéticos para la variable de respuesta tiempo de retención para cada experimento, así como los cálculos de contraste para cada factor:

Tabla 3.27 Resultado de los experimentos planteados en la Tabla 3.26 y contrastes calculados para cada factor.

Tiempo de retención por experimento (min)	Factores										
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
35	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-
43	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+
48	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-
32	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-
33	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-
36	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+
42	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+
48	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+
49	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-
33	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+
31	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+
34	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Contrastes por factor	4.2	1.6	1	-3.4	-3.2	2.2	3.6	0.8	-0.6	-0.8	0.2
Suma de cuadrados del factor	1470	0.213	0.083	0.963	0.853	0.403	1.080	0.053	0.030	0.053	0.003

Con la ecuación 3.44, se calcula la suma de cuadrados para cada factor:

$$SC_{cf} = \frac{C_f^2}{n} \quad \text{Ecuación 3.44}$$

Donde:

C_f = Contraste de cada factor f.

n = número de experimentos.

La suma de cuadrados de cada factor se presenta en la Tabla 3.27.

Se calcula además suma de cuadrados del error con los factores dummy a partir de la ecuación 3.45:

$$SC_e = \sum \frac{C_d^2}{n} \quad \text{Ecuación 3.45}$$

Donde:

C_d = Contraste de cada factor dummy d.

n = número de experimentos.

El cálculo de la suma de cuadrados del error, sería el siguiente:

$$SC_e = 0.030 + 0.053 + 0.003 = 0.086$$

La media de cuadrados del error se calcula con la ecuación 3.46:

$$MC_e = \frac{SC_e}{d} \quad \text{Ecuación 3.46}$$

Donde:

SC_e = Suma de cuadrados del error.

d = Número de factores dummy.

Para este ejemplo, la media de cuadrados del error es:

$$MC_e = \frac{0.086}{3} = 0.028$$

Para cada factor, se obtiene su valor de $F_{calculada}$ con la ecuación 3.47:

$$F_{calculada} = \frac{MC_{cf}}{MC_e} \quad \text{Ecuación 3.47}$$

El valor de media de cuadrados de cada factor es igual a su suma de cuadrados, ya que sólo le corresponde un grado de libertad. La $F_{calculada}$ se contrasta con el valor de $F_{1-\alpha/2, 1, d'}$ y si es mayor a ésta, se presenta un efecto del factor sobre la Robustez del método. En este ejemplo, como se muestra en la Tabla 3.28, se observa que ningún factor tendría un efecto significativo sobre la variable de respuesta tiempo de retención, con un nivel de confianza del 95%.

Tabla 3.28 Valores de F calculada para cada factor probado en el diseño propuesto en la Tabla 3.26.

Factor	A	B	C	D	E	F	G	H
$F_{calculada}$	50.88	7.38	2.88	33.35	29.54	13.96	37.38	1.85
$F_{0.95, 1, 3}$	55.55							

Un factor que representa especial interés durante la determinación de la Robustez del método, es el periodo durante el cual la muestra analítica permanece estable. El interés en la evaluación de la muestra analítica surge debido a la necesidad que se tiene, en muchas ocasiones, de almacenar la muestra durante un periodo de tiempo después de que se ha preparado para su análisis, tal vez como consecuencia de la secuencia de análisis que necesariamente se encuentra en un análisis automatizado (por, ejemplo, el tiempo de análisis de tres muestras por CLAR con inyección automática, con una corrida analítica que dura un tiempo prolongado) o como resultado de la necesidad de analizar un grupo de muestras de manera conjunta como parte de un protocolo de trabajo establecido (por ejemplo, muestras de fluidos biológicos en un estudio de biodisponibilidad).

Una forma de realizar un estudio de la estabilidad de la muestra para métodos de rutina en el análisis farmacéutico, consiste en preparar un grupo de muestras que se analizan de manera conjunta en un intervalo de tiempo reducido (el número de muestras dependerá del tiempo de análisis entre cada una de ellas) y una vez analizadas las muestras, se almacenan en las condiciones requeridas, para ser reanalizadas una vez transcurrido el periodo de tiempo que, a juicio de quien valida el método, sea requerido. Las condiciones y el tiempo de almacenamiento dependerán de las necesidades que se presentan comúnmente con dichas muestras, por ejemplo, si de manera cotidiana se requiere analizar 10 muestras por CLAR en un laboratorio, y el tiempo de corrida de cada muestra es de 15 minutos, el estudio de estabilidad deberá permitir demostrar que las muestras son estables al menos durante 150 minutos antes de su análisis; como otro ejemplo, es posible que las muestras sean preparadas y, por alguna razón, deban almacenarse hasta su análisis al otro día, por lo que se deberá demostrar si las muestras son estables durante todo el intervalo de tiempo que transcurre desde su preparación hasta la conclusión de su análisis, en las condiciones de almacenamiento requeridas (refrigeración, mesa de laboratorio, resguardadas de la luz, o las que correspondan)¹⁻⁷.

Para la demostración de la estabilidad mediante el análisis y posterior reanálisis de las mismas muestras, se presenta el ejemplo de la Tabla 3.29, donde se tienen resultados del análisis por CLAR de muestras que contienen un fármaco analizadas al tiempo inicial, y transcurridas cuatro horas después de su preparación.

Tabla 3.29 Resultados de un estudio de estabilidad de muestras analíticas.

Muestra	Área bajo la curva del pico cromatográfico (mAu*min)		Diferencia (d) entre las áreas bajo la curva (mAu*seg)
	t= 0h	T= 4h	
1	123456	122435	1021
2	124738	121456	3282
3	123421	122143	1278
4	122456	123543	-1087
5	124023	124789	-766
6	123043	122098	945
Promedio de las diferencias			778.83
Desviación estándar de las diferencias			1579.18

Para evaluar la estabilidad de las muestras, se puede inferir con respecto a la diferencia que existe entre el valor inicial y el valor final de la respuesta obtenida, en este caso en particular, de las áreas bajo la curva. Si la muestra es estable, se supone que el promedio de las diferencias es igual a cero, es decir:

$$H_o: \mu_d = 0$$

$$H_A: \mu_d \neq 0$$

Donde:

μ_d : Promedio de las diferencias entre las respuestas al inicio y al final del periodo de almacenamiento.

La hipótesis nula se puede comprobar a partir de la Ecuación 3.48^{11, 15}:

$$t = \frac{\bar{d} - \mu_d}{S_d}$$

Ecuación 3.4

Donde:

\bar{d} = Promedio de las diferencias obtenidas experimentalmente entre las respuestas al inicio y al final del periodo de almacenamiento.

μ_d = Promedio hipotético de las diferencias entre las respuestas al inicio y al final del periodo de almacenamiento.

S_d = Desviación estándar de las diferencias calculadas.--

A partir de la ecuación 3.48, se calcula el valor de t de Student:

$$t = \frac{778.83 - 0}{1579.18} = 0.493$$

El valor obtenido, se contrasta en el intervalo de no rechazo para la hipótesis nula, que comprende de $-t_{1-\alpha/2, n-1}$ a $t_{1-\alpha/2, n-1}$. Para el ejemplo, el intervalo va de -2.57 a 2.57 y, dado que la t de Student calculada es de 0.493, al no estar fuera de la región de no rechazo, se concluye que la muestra es estable por 4 horas, con un 95% de confianza.

3.8 Tolerancia del Método Analítico

3.8.1 ¿Qué es la Tolerancia del Método Analítico?

De acuerdo con la FEUM⁷, la Tolerancia del Método Analítico es el grado de Reproducibilidad de los resultados de prueba obtenidos del análisis de una misma muestra cuando se realizan las mediciones bajo diferentes condiciones de análisis, tales como laboratorios, marcas de reactivos, entre otros. Apegados a dicha definición, la Tolerancia representaría primordialmente lo que la guía Q2 de la ICH define como Reproducibilidad del Método Analítico, de manera conjunta con lo que en la misma guía se denomina Robustez, lo que genera confusión. En una definición más clara, **la Robustez puede definirse como la habilidad para reproducir el Método Analítico en diferentes laboratorios o bajo circunstancias diferentes sin que ocurran diferencias inesperadas entre los resultados obtenidos**³⁴⁻³⁵.

3.8.2 ¿Por qué demostrar la Tolerancia de un Método Analítico?

La demostración de la Tolerancia del Método Analítico no es un parámetro obligatorio, y mucho menos que se requiera de manera común durante un estudio de Validación pero, al igual que con la Robustez, puede representar una medida importante de la confiabilidad de los resultados que se obtienen con el Método Analítico cuando este es transferido entre laboratorios, o cuando se varían condiciones que no son intrínsecas a la operación del método, pero que sí pueden llegar a afectar sus resultados, como serían marcas de reactivos, proveedores o tipos de columnas, entre otros³⁶.

Para definir los factores que han de estudiarse durante un estudio de Tolerancia, es necesario, al igual que como ocurre con la Robustez, el conocimiento del procedimiento analítico de manera completa, de sus fundamentos y, por lo tanto, de aquellos factores que podrían considerarse como críticos en su desempeño. La definición de los factores a estudiar, dependerá primordialmente de las necesidades de los laboratorios usuarios del método.

3.8.3 ¿Para qué tipo de métodos se lleva a cabo la demostración de Tolerancia?

La demostración de Tolerancia de un Método Analítico resulta ser un parámetro **que puede ser demostrado para cualquier tipo de Método Analítico**, tomando siempre en cuenta el tipo de técnica analítica a emplear y el equipo, materiales e instrumentos asociados a la misma^{6,37}.

3.8.4 ¿Cómo se determina la Tolerancia de un Método Analítico?

Un primer alcance para la determinación de Tolerancia es aquel donde se está llevando a cabo un Método Analítico en diferentes laboratorios, y se desea probar, entonces, la Reproducibilidad del Método Analítico. En tal caso, la forma de determinar la Tolerancia podría apegarse a lo descrito en la sección 3.3.4.3 de este libro.

En una segunda instancia dentro de la misma definición de Tolerancia, nos enfrentaríamos a un razonamiento y forma de proceder idéntica que con la determinación de Robustez, por lo que la metodología y sistemas de medición que se han descrito en la sección 3.7.4 de este libro son aplicables en su totalidad al estudio de Tolerancia. De hecho, en la práctica, puede tenerse dificultad en diferenciar entre muchos de los factores que se estudian por considerarse críticos en el desempeño de un método durante la determinación de Tolerancia y Robustez, por lo que no es poco común que en muchos laboratorios de análisis farmacéutico se estudien conjuntamente Tolerancia y Robustez, sin sobrevalorar las diferencias que existen entre ambos conceptos, bajo el entendido que lo relevante es que se demuestra que el método permanece inalterado en sus resultados cuando se varían en un intervalo estrecho, premeditado y realista, los diferentes niveles de tales factores críticos. Por las razones expuestas en este párrafo, no se considera necesario ahondar más en este parámetro de desempeño³⁴⁻³⁵.

3.9 Resumen del Capítulo 3

Especificidad

- La Especificidad es la capacidad del Método Analítico para asegurar la presencia del analito en la muestra de manera inequívoca, aun cuando existan otros componentes que pudieran estar presentes en la muestra.
- De la definición de selectividad desaparece el término “de manera inequívoca”, y se habla de una gradualidad en la magnitud del resultado con respecto a la magnitud real del mensurando en la muestra.
- No existe un tipo de método (cuali o cuantitativo) para el que no se deba demostrar la Especificidad.

La Especificidad de un ensayo de identidad se podrá demostrar cuando:

- Se obtengan resultados positivos a partir de muestras que contienen al analito,
- Se obtengan resultados negativos para muestras que no contienen al analito.

En la demostración de Especificidad de un Método Analítico cualitativo para la determinación de impurezas, el Método Analítico será específico en la medida en que:

- Se obtengan resultados positivos a partir de muestras que contienen a la impureza.
- Se obtengan resultados negativos para muestras que no contienen a la impureza.

- En los casos en los que no se cuenta con las impurezas, no se conocen, o no están disponibles, es posible someter muestras a condiciones de estrés relevantes (tales como luz, humedad, hidrólisis, oxidación, entre otras) y comparar los perfiles de impurezas de las muestras sometidas a estas condiciones con respecto a las muestras originales. Otra posible oportunidad para demostrar la Especificidad del método, es aquella en la cual el método cromatográfico permite la determinación de la "pureza del pico".
- Para la demostración de la Especificidad en métodos para valoración, en los que se utilicen métodos que involucran una técnica de separación, la primera forma y más sencilla de demostrar la Especificidad es mediante la comprobación de la separación completa entre todas las señales analíticas obtenidas (analito e impurezas presentes en la muestra), cobrando de nuevo especial relevancia la determinación del valor para la resolución entre picos y, de ser necesario, demostrando la pureza del pico.

En el caso de que el Método Analítico no involucre una técnica de separación que permita la demostración de la resolución entre señales analíticas, es posible seguir dos estrategias:

- Cuantificar al analito en muestras originales utilizando el Método Analítico a validar y, por otra parte, a dichas muestras, adicionar cantidades conocidas de las impurezas o interferencias y analizar también en estas el contenido del analito aplicando el método correspondiente (muestras adicionadas).
- Si no se conocen o no se cuenta con las impurezas o productos que potencialmente interfirieran en los resultados cuantitativos, comparando los resultados de muestras que contienen las impurezas con un segundo Método Analítico ya caracterizado (establecido en la farmacopea o ya validado).

Linealidad

- La Linealidad se define como la capacidad del método de análisis para brindar resultados que son directamente proporcionales a la concentración (cantidad) del analito en la muestra.
- La generación de resultados cuantitativos a partir de un Método Analítico requiere un modelo matemático que permita, en un determinado intervalo de valores de concentración o de cantidad del analito presente en la muestra, demostrar que la relación entre dicha concentración y la respuesta es proporcional.
- La demostración de Linealidad se lleva a cabo para los métodos de análisis de tipo cuantitativo.
- Esta demostración debe ser realizada en el intervalo de concentraciones en el que se considera probable obtener un valor para la medición (misma que deberá ser exacta, precisa y, por supuesto, lineal), que se denomina intervalo de trabajo.

La determinación de la Linealidad puede realizarse:

- Para el fármaco: Aplicando el Método Analítico a diluciones de una solución stock del mismo.
- Para el medicamento: Aplicando el Método Analítico a pesadas independientes o diluciones de mezclas sintéticas de los componentes del medicamento.

- El primer análisis de datos a realizar será la inspección visual del diagrama de dispersión de los valores de y contra los valores de x .

- La manera más común de demostrar que existe una relación lineal entre una variable dependiente y la variable independiente involucra el análisis de los datos por el método de regresión por mínimos cuadrados. Debe obtenerse, como mínimo, los valores de la pendiente, ordenada al origen y coeficiente de correlación.

Para el caso de la pendiente, lo deseable es que:

- Sea diferente de cero, cuando se analiza la regresión respuesta vs concentración,
- No sea diferente de 1, cuando se analiza la regresión concentración recuperada vs concentración adicionada.

- Para el caso de la ordenada al origen es de esperarse, que su valor sea estadísticamente igual a cero.

- Para el coeficiente de correlación, se espera que su valor sea mayor o igual a 0.99.

Precisión

- La precisión se define como el grado de dispersión que existe entre una serie de mediciones del analito obtenidas a partir de la aplicación del Método Analítico a múltiples alícuotas de la misma muestra homogénea.

- Se puede demostrar en tres niveles, que son la repetibilidad, la Reproducibilidad y la Precisión Intermedia.
- La repetibilidad se refiere al grado de dispersión de los resultados analíticos obtenidos a partir del análisis múltiple de la misma muestra homogénea bajo las mismas condiciones de operación del método.
- La Reproducibilidad se refiere al grado de dispersión de los resultados analíticos obtenidos a partir del análisis múltiple de la misma muestra homogénea al variar en su totalidad las condiciones de operación del método.
- La Precisión Intermedia se refiere al grado de dispersión de los resultados analíticos obtenidos a partir del análisis múltiple de la misma muestra homogénea variando condiciones de operación del método (analista, día, equipo de medición, entre otras) dentro de un mismo laboratorio.
- Es durante la determinación de la precisión que se busca llegar a conocer la magnitud de error aleatorio a partir de las variaciones en las observaciones repetidas del mensurando, determinadas en múltiples ocasiones.
- La demostración de precisión, al igual que en el caso de Linealidad, se lleva a cabo para los métodos de análisis de tipo cuantitativo.

La repetibilidad del Método Analítico ha de demostrarse:

- Utilizando un mínimo de nueve determinaciones que cubran el intervalo especificado de trabajo para el método, o
- Utilizando un mínimo de seis determinaciones en el centro del intervalo de trabajo (100% de la concentración de prueba).

- No es poco común encontrar que, en vez de la comparación de los valores de CV de forma directa para las combinaciones de fuentes de variación, se proponga el análisis de varianza (ANADEVA) para demostrar estadísticamente tanto la Precisión Intermedia como la Reproducibilidad.

Exactitud

- La Exactitud de un Método Analítico se define como el grado de concordancia entre el valor que es aceptado, ya sea como un valor real convencional o un valor de referencia aceptado y el valor encontrado en la medición.
- Es necesario, con la demostración de la Exactitud del método, dar certeza de que las mediciones no se alejan de forma considerable del valor aceptado como real o verdadero del mensurando contenido en una muestra.
- La forma más sencilla para demostrar la Exactitud del Método Analítico para la valoración de una materia prima, consiste en aplicar el Método Analítico a un analito de pureza conocida, llevando a cabo un mínimo de nueve determinaciones en un mínimo de tres niveles de concentración.
- Posteriormente se procede al cálculo del porcentaje de recobro y se compara el resultado de la media aritmética de los porcentajes de recobro con el valor aceptado para la Exactitud
- En caso de no contarse con un material de referencia adecuado, es posible demostrar la Exactitud del método por comparación de los resultados obtenidos aplicando el método en estudio con aquellos que se obtienen aplicando un segundo método que haya sido bien caracterizado y cuya Exactitud ha sido establecida.

Para la determinación de Exactitud del Método Analítico para un método en el que se desea cuantificar un analito dentro de un medicamento es posible recurrir a métodos viables, tales como:

- Método del placebo cargado,
- Método del estándar adicionado, o
- Comparar los resultados con aquellos obtenidos a partir de un segundo procedimiento analítico bien caracterizado para el cual se ha demostrado o definido la Exactitud.

Límite de Detección

- El Límite de Detección de un Método Analítico se define como la menor cantidad del analito en una muestra que puede ser detectada pero no necesariamente cuantificada como un valor exacto.
- La aplicación más importante del Límite de Cuantificación es el establecimiento de un valor numérico de concentraciones a partir de las cuales el desempeño del método resulta insuficiente para una cuantificación aceptable, por lo que no debería tenerse confianza en mediciones realizadas de manera cuantitativa en esa región del intervalo de trabajo.
- La demostración de esta característica de desempeño debe realizarse para Métodos Analíticos cuantitativos cuya aplicación implique la determinación de concentraciones bajas del analito, es decir, en pruebas de impurezas tanto cuantitativas como límite, así como para métodos de la categoría III de la FEUM, como podría ser para la construcción de perfiles de disolución.
- El alcance más sencillo para la determinación del Límite de Detección es el método de evaluación visual.

- El segundo método recomendado para la determinación del Límite de Detección es aquel fundamentado en la relación señal-ruido de la respuesta.
- Una tercera forma de aproximación a la determinación del valor del Límite de Detección es la que se fundamenta en la relación que existe entre la desviación estándar de la respuesta analítica y la pendiente de la curva concentración vs respuesta.

Límite de Cuantificación

- El Límite de Cuantificación de un Método Analítico se define como la menor cantidad del analito en una muestra que puede ser determinada cuantitativamente con una adecuada precisión y Exactitud.
- Conforme nos acercamos a niveles bajos del intervalo de trabajo aceptable para el método, la incertidumbre de las mediciones tiende a incrementarse, por lo que resulta indispensable conocer el menor nivel de concentración en el cual es posible concluir que se mantiene la capacidad cuantitativa del método, es decir, la concentración más baja en la cual las determinaciones cuantitativas son aún confiables.
- La demostración de esta característica de desempeño debe realizarse para Métodos Analíticos cuantitativos de rutina cuya aplicación implique la determinación de concentraciones bajas del analito.

- El alcance más sencillo para la determinación del Límite de Cuantificación es también el método de evaluación visual.
- El segundo método recomendado para la determinación del Límite de Cuantificación se fundamenta en la relación señal-ruido de la respuesta.
- Una tercera forma de aproximación a la determinación del valor del Límite de Cuantificación es la que se fundamenta en la relación que existe entre la desviación estándar de la respuesta analítica y la pendiente de la curva concentración vs respuesta.

Robustez

- La Robustez se refiere a la capacidad del Método Analítico de permanecer inalterado en cuanto a sus resultados una vez que se presentan variaciones pequeñas, pero deliberadas, en sus condiciones normales de operación.
- Durante la operación cotidiana en el laboratorio analítico, habrá procesos específicos que forman parte de un determinado procedimiento (método) analítico que, si no se controlan con suficiente cuidado, potencialmente tendrán un efecto sobre el desempeño del mismo, dando lugar a la obtención de resultados analíticos erróneos, por lo que el estudio de Robustez es indispensable.

- La demostración de esta característica de desempeño debe realizarse para todos los Métodos Analíticos, bajo el supuesto de que el mejor control de los factores críticos del procedimiento analítico permitirá mantener la confiabilidad de los resultados analíticos durante el periodo de uso del método.
- De manera general, la determinación de Robustez de un Método Analítico puede consistir de dos etapas, la primera inicia desde la fase de desarrollo del mismo, y la segunda concluye durante el estudio de la Validación del método.
- Partimos del hecho que, durante la etapa de desarrollo del método, es cuando se conocen los factores críticos que pueden afectar el desempeño cotidiano del mismo, ya que son los que normalmente se modifican durante la implementación, para arribar al mejor resultado analítico.
- Ya en la etapa de Validación del método, el estudio de Robustez implica variar de manera deliberada, en el intervalo de niveles esperados, los factores que se consideran críticos para la obtención de los resultados analíticos, generar dichos resultados y analizar si las variaciones presentan o no un impacto significativo en la respuesta.
- El estudio de Robustez podría realizarse mediante la comparación de la diferencia de las medias de las muestras cuando se trata de pocos factores a analizar.

- Cuando el número de factores a analizar en el estudio de Robustez es grande, resulta común recurrir a diseños de experimentos de cribado para disminuir de manera significativa el número de corridas analíticas y así obtener una estimación más adecuada de la Robustez del método.
- Un factor que representa especial interés durante la determinación de la Robustez del método, es el periodo durante el cual la muestra analítica permanece estable.
- Para evaluar la estabilidad de las muestras, se puede inferir con respecto a la diferencia que existe entre el valor inicial y el valor final de la respuesta obtenida.

Tolerancia

- La Tolerancia puede definirse como la habilidad para reproducir el Método Analítico en diferentes laboratorios o bajo circunstancias diferentes sin que ocurran por ello diferencias inesperadas entre los resultados obtenidos.
- La determinación de Tolerancia puede representar una medida importante de la confiabilidad de los resultados que se obtienen con el Método Analítico cuando este es transferido entre laboratorios, o cuando se varían condiciones que no son intrínsecas a la operación del método, pero que sí pueden llegar a afectar sus resultados, como serían marcas de reactivos, proveedores o tipos de columnas, entre otros.

- La demostración de Tolerancia de un Método Analítico resulta ser un parámetro que puede ser demostrado para cualquier tipo de Método Analítico, tomando siempre en cuenta el tipo de técnica analítica a emplear y el equipo, materiales e instrumentos asociados a la misma.
- Un primer alcance para la determinación de Tolerancia es aquel donde se está llevando a cabo un estudio de Reproducibilidad del método.
- En una segunda instancia dentro de la misma definición de Tolerancia, nos enfrentaríamos a un razonamiento y forma de proceder idéntica que con la determinación de Robustez.

3.10 Bibliografía del Capítulo 3

1. ICH Expert Working Group. Validation of analytical methods. Text and methodology Q2(R1) [Internet]. International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use; 2005 [citado 2016 Jun 28]. 13 p. Disponible en: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf.
2. Centro Nacional de Metrología. Métodos Analíticos adecuados a su propósito. Guía de laboratorio para la Validación de métodos y temas relacionados. Publicación técnica CNM-MRD-PT-030. 2ª edición. Los Cués, Querétaro, México: Centro Nacional de Metrología; 2005.
3. Ellison S, Williams A. Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement. EURACHEM/CITAC Guide Number 4. 3rd edition. Teddington, United Kingdom: Eurachem/CITAC; 2012.
4. The United States Pharmacopeial Convention. The United States Pharmacopeia. 39th ed. Rockville, Maryland: The United States Pharmacopeial Convention Inc; 2015.
5. Stöckl D, D'Hondt H, Thienpont L. Method validation across the disciplines- critical investigation of major validation criteria and associated experimental protocols. J Chromatography B. 2009; 877:2180-90.
6. Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. 11ª edición. México D.F: Secretaría de Salud; 2015.
7. McPolin O. Validation of analytical methods for pharmaceutical analysis. Warrenport, Northern Ireland, United Kingdom: Mourn training services; 2009.
8. Vázquez I. Evaluación del efecto de la solubilidad de polimorfos de glibenclamida en su capacidad de incorporación en implantes fabricados por la técnica sol-gel. Tesis de licenciatura. Ciudad de México: Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México; 2016.
9. De Santiago R. Desarrollo de matrices sol-gel como alternativa para mejorar la estabilidad de ibuprofeno o de indometacina. Tesis de

- licenciatura. México D.F: Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México; 2014.
10. López J. Producción de matrices poliméricas sol-gel de liberación modificada incorporando el sólido amorfo de glibenclamida. Tesis de licenciatura. México D.F: Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México; 2016.
 11. Mendenhall W, Reinmuth J. Estadística para Administración y Economía. México D.F; Grupo Editorial Iberoamérica; 1981.
 12. Borman P, Chatfield M, Damjanov I, Jackson P. Design and analysis of method equivalence studies. *Anal Chem.* 2009; 81(24):9849-57.
 13. Lung R, Gorko M, Llewelyn J, Wiggins N. Statistical method for determination of equivalence of automated test procedures. *J Automat Met Manag Chem.* 2003; 25(6):123-127.
 14. Daniel W. Bioestadística. Base para el análisis de las ciencias de la salud. 3ª ed. México D.F: UTEHA; 1998.
 15. Chow S, Liu J. Statistical design and analysis in pharmaceutical sciences. New York, USA: Marcel Dekker Inc; 1995.
 16. Bell S. A Beginner's Guide to Uncertainty of Measurement. Measurement Good Practice Guide No. 11 (Issue 2). Teddington, Middlesex, United Kingdom: Centre for Basic, Thermal and Length Metrology, National Physical Laboratory; 2001.
 17. Sección de laboratorio y asuntos científicos. Directrices para la Validación de Métodos Analíticos y la calibración del equipo utilizado para el análisis de drogas ilícitas en materiales incautados y especímenes biológicos. New York, USA: Oficina de las Naciones Unidas contra la droga y el delito; 2010.
 18. International Society for Pharmaceutical Engineering. Technology transfer. Tampa, Florida: International Society for Pharmaceutical Engineering Tampa Florida USA; 2003.
 19. Araujo P. Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation. *J Chromatography B.* 2009; 877:2224-34.
 20. Comisión de Validación de Métodos Analíticos. Métodos Analíticos. Guía de Validación. Ciudad de México: Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México; 2002.
 21. Taverniers I, De Loose M, Van Bockstaele E. Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality

- assurance. *Trends Anal Chem.* 2004; 8(23):535-52.000
22. Thompson M, Ellison S, Wood R. The international harmonized protocol for the proficiency testing of Analytical Chemistry laboratories (IUPAC Technical Report). *Pure Appl Chem.* 2006; 78(1):145-196.
 23. Hauck WW, Koch W, Abernethy D, Williams RL. Making sense of trueness, precision, accuracy, and uncertainty. *Pharmacoepial Forum.* 2008; 34(3):838-842.
 24. The United States Pharmacopeial Convention. Statistical tools for procedure validation. *Pharmacoepial forum.* 2014; 40(5).
 25. Santana Y. Diseño de las condiciones experimentales para la construcción de perfiles de disolución de glibenclamida liberada a partir de monolitos elaborados por la técnica sol-gel. Tesis de licenciatura. México D.F: Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México; 2016.
 26. ICH Expert Working Group. Topic Q3A(R2): Impurities in New drug substances [Internet]. International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use; 2006 [citado 2016 Jun 28]. 13 p. Disponible en: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q3A_R2/Step4/Q3A_R2__Guideline.pdf.
 27. ICH Expert Working Group. Impurities: Guideline for residual solvents. Q3C(R5) [Internet]. International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use; 2006 [citado 2016 Jun 28]. 13 p. Disponible en: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q3C/Step4/Q3C_R5_Step4.pdf.
 28. ICH Expert Working Group. Topic Q3B(R2): Impurities in New drug products [Internet]. International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use; 2006 [citado 2016 Jun 28]. 13 p. Disponible en: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q3B_R2/Step4/Q3B_R2__Guideline.pdf
 29. Horwitz W, Kamps L, Boyer K. Quality assurance in the analysis of foods and trace constituents. *J Assoc Off Anal Chem.* 1980; 63(6):1344-54.
 30. González A, Herrador M. A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles. *Trends Anal Chem.* 2007; 26(3): 227-38.

31. Ermer J, Miller J. Method validation in pharmaceutical analysis, a guide to best practice. New York: Wiley; 2005.
32. Watson D, Edrada-Ebel R. Pharmaceutical analysis. A textbook for Pharmacy students and pharmaceutical chemists. 3rd edition. Edinburgh, Ireland: Churchill Livingstone Elsevier; 2012.
33. Basal S, Layloff T, Bush E, Hamilton M, Hankinson E, Landy J, Lowes S, Nasr M, Saint Jean P, Shah V. Qualification of analytical instruments for use in the pharmaceutical industry: a scientific approach. AAPS Pharm Sci Tech. 2004; 5(1):151-8.
34. Van Leeuwen J, Buydens L, Vandeginste B, Kateman G, Schoenmakers P, Mulholland M. RES, an expert system for the set-up and interpretation of a ruggedness test in HPLC method validation. Part 1 : The ruggedness test in HPLC method validation; Chemometr Intelligent Lab Sys. 1991; 10:337-347.
35. Vander Heyden Y, Questier F, Massart D. Ruggedness testing of chromatographic methods: selection of factors and levels; J Pharm Biomed Anal. 1998; 18:43-56.
36. Chauhan A, Mittu B, Chauhan P. Analytical method development and validation: a concise review. J Anal Bioanal Tech. 2015; 6(1):233-237.
37. Rozet E, Ceccato A, Hubert C, Ziemons E, Oprean R, Rudaz S, Boulanger B, Hubert H. Analysis of recent pharmaceutical regulatory documents on analytical method validation. J Chromatography A. 2007; 1158: 111-125.
38. Miller C, Miller J. Statistics for Analytical Chemistry. New York, USA: Ellis Horwood; 1993.
39. Plackett R, Burman J. The design of optimum multifactorial experiments. Biometrika 1946; 33:305-325.

Capítulo 4

Documentación
para la planeación,
ejecución y
conclusión de
la Validación de
Métodos Analíticos
para el laboratorio
farmacéutico de
Control de Calidad



Una vez que ya se han definido una serie de conceptos relevantes a la Validación de Métodos Analíticos, que se han esclarecido requisitos de inicio para asegurar la confiabilidad de los resultados, y que se han no solamente definido, sino explicado de manera amplia los parámetros de desempeño a demostrar durante un estudio de Validación, resulta necesario el desarrollar una explicación, a manera de guía, que permita aproximar al lector a una adecuada planeación, ejecución y conclusión de los estudios de Validación. Como ya se explicó anteriormente, y dado el alcance de este libro, sólo se abordarán los métodos de las categorías descritas en la guía Q2 de la ICH¹.

4.1 Alcance y contenidos generales del protocolo de Validación de un Método Analítico

Como ya se ha mencionado anteriormente, un elemento esencial para el cumplimiento de las Buenas Prácticas de Fabricación es la Validación. **La documentación de la Validación se fundamenta en el Plan Maestro de Validación (PMV)**, que debe contener, dentro de muchos documentos, los Métodos Analíticos, con sus respectivos protocolos de Validación. En México, se establece que los Métodos Analíticos no detallados en la farmacopea deben validarse conforme a la FEUM y sus suplementos, y que cuando se utilizan métodos detallados en la farmacopea, se debe demostrar la verificación del sistema y su aplicabilidad al producto e instalaciones^{2,3}.

En estricto apego a la definición normativa, **un protocolo es un plan de trabajo escrito que establece los objetivos, procedimientos, métodos y criterios de aceptación, para realizar un estudio**². Derivado de lo anterior, **en un protocolo de Validación se harán explícitos aquellos aspectos que permitan cumplir, de manera total, los requisitos de dicho plan de trabajo**^{4,5}.

- a. Los objetivos del estudio: Para esclarecerlos, debe documentarse de manera detallada el Método Analítico, dando no solamente una descripción del mismo, sino también puede referirse, de manera concisa pero clara, el fundamento de los procesos y técnicas empleadas en las etapas del método, de tal manera que permitan al analista tener una idea nitida de los factores que afectan a la medición.
- b. Los procedimientos: Se debe especificar cuáles son los parámetros de desempeño a probar durante el estudio de Validación, a la luz

de la necesidad de demostrar que el Método Analítico es útil para la aplicación específica. Deben definirse las responsabilidades del personal involucrado en la Validación del procedimiento analítico.

- c. Los métodos: No puede omitirse la relación de materiales, equipos, reactivos, materiales de referencia, así como los lotes de muestras que han de ser utilizados. Debe detallarse la forma de realizar los experimentos que permiten demostrar los parámetros de desempeño, a manera de procedimiento, en el que se establecerán, entre otros: el tipo y número de soluciones a utilizar, cómo se prepararán, cómo se tratarán las muestras, cómo se realizarán las mediciones. Así mismo, debe establecerse de manera clara la forma en que se presentarán los datos y el tratamiento que se les dará para obtener los resultados que podrían requerirse para demostrar que se cumple con el parámetro de desempeño.
- d. Los criterios de aceptación. Deben ser explícitas las especificaciones que se deberán cubrir para cada parámetro de desempeño del método. Estas especificaciones provendrán de criterios regulatorios específicos, aunque no es poco común que deriven también de protocolos internos de los laboratorios que, en muchas ocasiones, resultan ser más estrictos que las mismas especificaciones regulatorias.

En las siguientes secciones, se ahondará en aspectos que pueden ser considerados para la construcción exitosa de un protocolo de Validación para Métodos Analíticos con diferentes objetivos o aplicaciones.

4.2 Aspectos a considerar en protocolos de Validación de Métodos Analíticos de acuerdo con su aplicación y objetivo

4.2.1 Protocolo de Validación de Métodos Analíticos para ensayos de identidad

Si hacemos referencia a las Tablas 1.1 y 1.2, de este libro, puede notarse que los métodos que se aplican para la identificación de analitos en fármacos, aditivos, o preparados farmacéuticos, y cuyo objetivo es establecer la presencia del analito de interés en dicha muestra, **requieren de manera forzosa la demostración de su Especificidad o selectividad, así como de su Robustez**^{1, 6-7}.

4.2.1.1 Demostración de Especificidad para el ensayo de identidad

Claramente, el objetivo de la determinación de este parámetro de desempeño radica en demostrar que el método no brinda una respuesta positiva para muestras que no contienen al analito de interés, junto con la necesidad de demostrar que se obtiene una respuesta positiva para muestras que contienen al analito. Deben seleccionarse condiciones que permitan probar que la presencia de aquellas sustancias presentes en la muestra y que son similares en estructura no brindarán resultados que puedan ser confundidos con aquellos obtenidos con el analito de interés. Para ello, es necesario tener conocimiento pleno del Método Analítico y del proceso de fabricación de la muestra a analizar^{1, 6-7}.

A partir de lo anterior, una propuesta general de protocolo resumido para la demostración de Especificidad o selectividad para este tipo de métodos se presenta en la Tabla 4.1.

4.2.2 Protocolo de Validación de Métodos Analíticos para pruebas límite de impurezas

Los métodos que se aplican para determinar impurezas en fármacos, aditivos, o preparados farmacéuticos, y cuyo objetivo es establecer si dichas impurezas (que son los analitos de interés) exceden o no un determinado límite, **requieren de manera forzosa la demostración de Especificidad o selectividad y la de Límite de Detección**^{1, 6-7}.

Tabla 4.1 Propuesta de protocolo resumido para la demostración de selectividad para ensayos de identidad^{1, 6, 7}.

Parámetro de desempeño	Experimentos que pueden realizarse	Criterios de aceptación típicos
Especificidad	Comparar el resultado obtenido aplicando el método al analito y a un estándar de referencia.	La medición, el espectro, el cromatograma o cualquier respuesta analítica que resulte de la medición debe ser la misma para el analito que para el estándar.
	Analizar con el Método Analítico muestras que contengan al analito y muestras que no lo contengan, incluyendo entre estas últimas aquellas a las que se les hayan adicionado sustancias relacionadas estructuralmente de manera estrecha con el analito.	El método debe ser capaz de brindar respuestas positivas cuando está presente el analito. El método debe ser capaz de distinguir al analito en presencia de las sustancias estructuralmente relacionadas con éste. Deben obtenerse respuestas negativas cuando el analito no está presente en la muestra.

4.2.2.1 Demostración de Especificidad para pruebas límite de impurezas

El objetivo de la determinación de este parámetro de desempeño en pruebas límite de impurezas es básicamente el mismo que para ensayos de identidad: demostrar que el método no brinda una respuesta positiva para muestras que no contienen al analito de interés, junto con la necesidad de demostrar que se obtiene una respuesta positiva para muestras que contienen al analito, en la concentración necesaria del mismo para que se obtenga la respuesta. Deben seleccionarse condiciones que permitan probar que la presencia de aquellas sustancias presentes en la muestra y que son similares en estructura no brindarán resultados que puedan ser confundidos con aquellos obtenidos con el analito de interés^{1,6-7}.

Una propuesta general de protocolo resumido para la demostración de Especificidad o selectividad para este tipo de métodos se presenta en la Tabla 4.3.

4.2.2.2 Demostración de Límite de Detección para pruebas límite de impurezas

En este tipo de métodos se busca determinar la concentración menor del analito en que todavía se obtiene respuesta, cercano al límite establecido en la prueba. Como ya se había mencionado anteriormente, **el alcance más sencillo para la determinación del Límite de Detección es el método de evaluación visual**. Si se menciona en un protocolo para la determinación de impurezas de conformidad con guías específicas, como podría ser la serie Q3 de ICH⁸⁻¹⁰, que el umbral de detección aceptado es de un determinado porcentaje, entonces las determinaciones repetidas de una muestra preparada artificialmente en la que se haya adicionado al analito en esa concentración y en las que se obtenga una respuesta positiva, darían como resultado el Límite de Detección.

Tabla 4.2 Propuesta de protocolo resumido para la demostración de Especificidad para pruebas límite de impurezas^{1, 6, 7}.

Parámetro de desempeño	Experimentos que pueden realizarse	Criterios de aceptación típicos
Especificidad	Comparar el resultado obtenido aplicando el método al analito y a un estándar de referencia, en la concentración necesaria para obtener la respuesta	La medición, el espectro, el cromatograma o cualquier respuesta analítica que resulte de la medición debe ser la misma para el analito que para el estándar
	Analizar con el Método Analítico muestras que contengan al analito (en la concentración necesaria para obtener una respuesta) y muestras que no lo contengan, incluyendo entre estas últimas aquellas a las que se les hayan adicionado sustancias relacionadas estructuralmente de manera estrecha con el analito	El método debe ser capaz de brindar respuestas positivas cuando está presente el analito El método debe ser capaz de distinguir al analito en presencia de las sustancias estructuralmente relacionadas con éste. Deben obtenerse respuestas negativas cuando el analito no está presente en la muestra.

Una propuesta general de protocolo resumido para la demostración de Límite de Detección para pruebas límite de impurezas se muestra en la Tabla 4.3.

Tabla 4.3 Propuesta de protocolo resumido para la demostración de Límite de Detección para pruebas límite de impurezas^{1,6,7}.

Parámetro de desempeño	Experimentos que pueden realizarse	Criterios de aceptación típicos
Límite de Detección	Preparar seis muestras en el nivel de concentración que se espera sea el Límite de Detección, que puede ser el umbral de detección especificado para la impureza (o cercanas en concentración a este) por adición del analito (placebo cargado o estándar adicionado). Obtener la respuesta analítica de tales muestras.	Debe obtenerse un resultado analítico positivo a partir de las muestras adicionadas con analito

4.2.3 Protocolo de Validación de Métodos Analíticos para cuantificación de impurezas

Los métodos que se aplican para determinar impurezas en fármacos, aditivos, o preparados farmacéuticos, y cuyo objetivo es establecer si dichas impurezas (que son los analitos de interés) están presentes en una determinada cantidad en la muestra, **requieren de manera forzosa la demostración de Especificidad, Linealidad, Exactitud, precisión, límites de detección y cuantificación y Robustez**^{1,6-7}.

4.2.3.1 Demostración de Especificidad para pruebas cuantitativas de impurezas

El objetivo de la determinación de este parámetro de desempeño en pruebas cuantitativas de impurezas implica el demostrar que la respuesta debida al analito de interés no se ve afectada por interferencias potenciales que puedan estar también presentes en la muestra.^{1, 4, 11.}

Una propuesta general de protocolo resumido para la demostración de Especificidad o selectividad para este tipo de métodos se presenta en la Tabla 4.4.

Tabla 4.4 Propuesta de protocolo resumido para la demostración de Especificidad para pruebas cuantitativas de impurezas o para métodos para valoración de contenido^{1, 11, 12.}

Parámetro de desempeño	Experimentos que pueden realizarse	Criterios de aceptación típicos
Especificidad	Analizar muestras que contengan las interferencias potenciales (impurezas, excipientes) Preparar muestras adicionando el o los materiales que interfieren potencialmente al medicamento o a la muestra. O preparar muestras de los materiales que potencialmente interfieren O llevar a cabo pruebas de estrés en la muestra Si el método es cromatográfico: Investigar pureza de pico del analito En todos los casos, el nivel de impurezas a adicionar o investigar debe ser el que se espera esté típicamente presente en la muestra	No deben observarse interferencias en la respuesta Si el método es cromatográfico: No debe haber picos que interfieran con la señal de interés La resolución entre el pico de interés y los picos vecinos debe ser mayor a 1.6 No debe haber co-elución de picos.

4.2.3.2 Demostración de Linealidad para pruebas cuantitativas de impurezas

Es necesario demostrar que la respuesta analítica es proporcional a la concentración, en el intervalo deseado. El intervalo comúnmente abarca del Límite de Cuantificación al 120% de la especificación establecida para la concentración de la impureza. Lo más recomendable es preparar la curva a partir de pesadas separadas de muestras sintéticas de los componentes de la muestra, a las que se les ha adicionado el analito de interés.^{1,4}

Una propuesta general de protocolo resumido para la demostración de Linealidad para este tipo de métodos se presenta en la Tabla 4.5.

Tabla 4.5 Propuesta de protocolo resumido para la demostración de Linealidad para pruebas cuantitativas de impurezas^{1,4}.

Parámetro de desempeño	Experimentos que pueden realizarse	Criterios de aceptación típicos
Linealidad	Preparar una curva del analito en la muestra en concentraciones que van del Límite de Cuantificación (LC) al 120% de la especificación para la impureza.	Demostrar que el modelo de calibración es válido Demostrar que no hay tendencias sistemáticas en el diagrama de dispersión de residuales Demostrar que la ordenada al origen es igual a cero, la pendiente diferente de cero, con una confianza del 95%

4.2.3.3 Demostración de Exactitud para pruebas cuantitativas de impurezas

Es necesario demostrar que la respuesta analítica es concordante con aquella que se acepta como real o de referencia. El intervalo de concentraciones en el que se debe demostrar la Exactitud va del Límite de Cuantificación (LC) al 120% de la especificación para la impureza, en tres niveles de concentración, que pueden ser el del LC, el del 50% del nivel aceptado para la impureza, y el del 120% de la especificación para la impureza- resulta por demás claro que, de acuerdo con lo mencionado en el Capítulo 3, los coeficientes de variación para recobros en niveles bajos de concentración serán elevados, en virtud de la variación esperada para las determinaciones ^{1,4}.

Una propuesta general de protocolo resumido para la demostración de Exactitud para este tipo de métodos se presenta en la Tabla 4.6.

Tabla 4.6 Propuesta de protocolo resumido para la demostración de Exactitud para pruebas cuantitativas de impurezas^{1,4}.

Parámetro de desempeño	Experimentos que pueden realizarse	Criterios de aceptación típicos
Exactitud	Determinar en al menos tres concentraciones, por triplicado, que pueden ser: La menor igual al Límite de Cuantificación (LC), la central al 50% de la especificación de la impureza, y la tercera al 120% de la especificación para la impureza.	Recobros promedio del 90-110% Recobros individuales del 70-130% Si se utiliza regresión lineal, la pendiente debe estar entre 0.9 y 1.1, el intervalo de confianza incluir al 1.0, para la curva cantidad adicionada vs cantidad recuperada

4.2.3.4 Demostración de precisión para pruebas cuantitativas de impurezas

Es necesario demostrar que múltiples determinaciones de la misma muestra analítica no presentan variaciones significativas entre sí (repetibilidad), así como que la variación de factores como analistas y días no tiene un impacto significativo en la concordancia entre determinaciones realizadas sobre la misma muestra.

En el caso de la repetibilidad, se recomienda un mínimo de nueve determinaciones en el intervalo de estudio del método, o de seis determinaciones al 100% de la especificación, que será en este caso la establecida para la impureza. El mismo número de determinaciones se recomienda para los estudios de Precisión Intermedia y Reproducibilidad. Se prefiere el análisis de muestras reales para este tipo de experimentos, así que debe contarse con una muestra en la que esté presente la impureza de interés, o trabajar con muestras preparadas. Si se trabaja con muestras preparadas artificialmente, pueden investigarse de manera conjunta los parámetros de Exactitud y precisión.

La aceptación del nivel de precisión depende, como ya se había mencionado anteriormente, de los valores de coeficiente de variación. Para métodos cuantitativos para impurezas, se aceptan coeficientes de variación <2%, <10% y <15% para Precisión del Sistema, repetibilidad y Precisión Intermedia/Reproducibilidad, respectivamente^{1,4}.

Una propuesta general de protocolo resumido para la demostración de precisión para este tipo de métodos se presenta en la Tabla 4.7.

Tabla 4.7 Propuesta de protocolo resumido para la demostración de precisión para pruebas cuantitativas de impurezas^{1,4}.

Parámetro de desempeño	Experimentos que pueden realizarse	Criterios de aceptación típicos
Precisión del Sistema	Determinarla con seis mediciones o inyecciones repetidas de la misma muestra	CV < 2.0%
Repetibilidad	Analizar por sextuplicado una muestra homogénea a la concentración esperada para la impureza O analizar por triplicado, en tres niveles de concentración, muestras preparadas artificialmente (si se determina de manera conjunta con Exactitud)	CV < 10.0%
Precisión Intermedia	Analizar muestras de repetibilidad con diferentes días, instrumentos, analistas, etc. Llevar a cabo un diseño de experimentos con los factores a estudiar	CV < 15.0%
Reproducibilidad	Analizar en diferentes laboratorios las muestras de repetibilidad, utilizando el diseño de experimentos	CV < 15.0%

4.2.3.5 Demostración de Límite de Cuantificación/Límite de Detección para pruebas cuantitativas de impurezas

El número adecuado de muestras a analizar para demostrar Límite de Detección y Límite de Cuantificación dependerá en gran medida de la variabilidad del método en niveles bajos de concentración (lo que, en gran medida, es función de la técnica analítica). Para la mayoría de los métodos para la cuantificación de impurezas ya se conocen los límites, por lo que el estudio consistirá en preparar el número de muestras suficientes y corroborar los niveles respectivos. Si se obtienen los valores a partir de la desviación estándar del blanco, la determinación por sextuplicado parece ser adecuada. Si se determina a partir de la desviación estándar de la regresión de la curva concentración vs respuesta, debe recordarse que se recomienda un mínimo de ocho concentraciones en la curva para tener mayor certeza en la determinación de $S_{y/x}$.

Una propuesta general de protocolo resumido para la demostración de Límite de Detección y Límite de Cuantificación para este tipo de métodos se presenta en la Tabla 4.8.

Tabla 4.8 Propuesta de protocolo resumido para la demostración de Límite de Detección y Límite de Cuantificación para pruebas cuantitativas de impurezas^{1,4}.

Parámetro de desempeño	Experimentos que pueden realizarse	Criterios de aceptación típicos
Límite de Detección	Preparar seis muestras en o cerca del Límite de Detección (pueden obtenerse a partir de LC/3 por adición del estándar) A partir de una curva concentración vs respuesta en 8 niveles de concentración	~ 0.01 a 0.02% del valor esperado ~ 3:1 señal:ruido Con los datos de la curva
Límite de Cuantificación	Preparar seis muestras en o cerca del Límite de Cuantificación (pueden obtenerse por adición del estándar) A partir de una curva concentración vs respuesta en 8 niveles de concentración	~ 0.01 a 0.02% del nominal ~ 10:1 señal:ruido Con los datos de la curva

4.2.4 Protocolo de Validación de Métodos Analíticos para valoración

Los métodos que se aplican para determinar la cantidad de analito presente en una determinada muestra (pureza, potencia, valoración), **requieren de manera forzosa la demostración de Especificidad, Linealidad, Exactitud, precisión y Robustez**^{1, 6-7}.

4.2.4.1 Demostración de Especificidad para Métodos Analíticos para valoración

El objetivo de la determinación de este parámetro de desempeño en métodos para valoración implica el demostrar que la respuesta debida al analito de interés no se ve afectada por interferencias potenciales que puedan estar también presentes en la muestra.^{1, 4, 11}

Una propuesta general de protocolo resumido para la demostración de Especificidad o selectividad para este tipo de métodos se presenta en la Tabla 4.4.

4.2.4.2 Demostración de Linealidad para métodos para valoración de contenido

Es necesario demostrar que la respuesta analítica es proporcional a la concentración, en el intervalo deseado. El intervalo comúnmente abarca del 80 al 120% de la especificación establecida para la concentración nominal del analito. Debido a que se requiere un valor de ordenada al origen para demostrar la validez del modelo, no resulta inadecuado del todo adicionar una concentración en la curva del 40%, y medir también la respuesta de la misma, incorporándola a la regresión lineal. Lo más recomendable es preparar la curva a partir de pesadas separadas de muestras sintéticas de los componentes de la muestra, a las que se les ha adicionado el analito de interés.^{1, 4}. Debe tenerse especial cuidado en mantener el orden de magnitud de la curva respuesta vs concentración, o ponderar la respuesta si se tienen más de dos órdenes de magnitud⁴.

Una propuesta general de protocolo resumido para la demostración de Linealidad para este tipo de métodos se presenta en la Tabla 4.9.

Tabla 4.9 Propuesta de protocolo resumido para la demostración de Linealidad para valoración de contenido^{1,4}.

Parámetro de desempeño	Experimentos que pueden realizarse	Criterios de aceptación típicos
Linealidad	Preparar una curva del analito en la muestra en concentraciones que van del 80% al 120% de la especificación para el analito. Puede adicionarse un nivel de 40% para un mejor ajuste	Demostrar que el modelo de calibración es válido Demostrar que no hay tendencias sistemáticas en el diagrama de dispersión de residuales Demostrar que la ordenada al origen es igual a cero, la pendiente diferente de cero, con una confianza del 95%

4.2.4.3 Demostración de Exactitud en Métodos Analíticos para valoración

Es necesario demostrar que la respuesta analítica es concordante con aquella que se acepta como real o de referencia. El intervalo de concentraciones en el que se debe demostrar la Exactitud va del 80% al 120% de la especificación para la impureza, en tres niveles de concentración, que pueden ser el de 80%, el del 100% del nivel aceptado para la especificación, y el del 120% de la especificación para el analito⁴. Es de esperar recobros cercanos al 100%, ya que el intervalo de concentraciones en el que se determina la Exactitud es muy estrecho, y normalmente las técnicas analíticas empleadas en métodos para valoración permiten niveles de coeficientes de variación bajos¹¹⁻¹².

Una propuesta general de protocolo resumido para la demostración de Exactitud para este tipo de métodos se presenta en la Tabla 4.10.

Tabla 4.10 Propuesta de protocolo resumido para la demostración de Exactitud en métodos para valoración de contenido^{1, 4}.

Parámetro de desempeño	Experimentos que pueden realizarse	Criterios de aceptación típicos
Exactitud	Determinar en al menos tres concentraciones, por triplicado, que pueden ser: La menor igual al 80%, la central al 50% de la especificación, y la tercera al 120% de la especificación para el analito	Recobros promedio del 98-102% Recobros individuales del 97-103% Si se utiliza regresión lineal, la pendiente debe estar entre 0.98 y 1.02, el intervalo de confianza incluir al 1.0, para la curva cantidad adicionada vs cantidad recuperada

4.2.4.4 Demostración de precisión en Métodos Analíticos para valoración

En el caso de la repetibilidad, se recomienda un mínimo de nueve determinaciones en el intervalo de estudio del método (80% a 120%), o de seis determinaciones al 100% de la especificación, que será en este caso la establecida para el analito. El mismo número de determinaciones se recomienda para los estudios de Precisión Intermedia y Reproducibilidad. Se prefiere el análisis de muestras reales para este tipo de experimentos, con lo que bastaría la determinación en ese caso por sextuplicado al 100%⁴.

La aceptación del nivel de precisión depende, como ya se había mencionado anteriormente, de los valores de coeficiente de variación. En Métodos Analíticos para valoración de contenido, se aceptan coeficientes de variación $\leq 1\%$, $< 2\%$ y $< 3\%$ para Precisión del Sistema, repetibilidad y Precisión Intermedia/Reproducibilidad, respectivamente^{1, 4}.

Una propuesta general de protocolo resumido para la demostración de precisión para este tipo de métodos se presenta en la Tabla 4.11.

Tabla 4.11 Propuesta de protocolo resumido para la demostración de precisión en Métodos Analíticos para la valoración de contenido^{1,4}.

Parámetro de desempeño	Experimentos que pueden realizarse	Criterios de aceptación típicos
Precisión del Sistema	Determinarla con seis mediciones o inyecciones repetidas de la misma muestra	CV% < 1.0%
Repetibilidad	Analizar por sextuplicado una muestra homogénea a la concentración esperada para la impureza O analizar por triplicado, en tres niveles de concentración, muestras preparadas artificialmente (si se determina de manera conjunta con Exactitud)	CV% < 2.0%
Precisión Intermedia	Analizar muestras de repetibilidad con diferentes días, instrumentos, analistas, etc. Llevar a cabo un diseño de experimentos con los factores a estudiar	CV% < 3.0%
Reproducibilidad	Analizar en diferentes laboratorios las muestras de repetibilidad, utilizando el diseño de experimentos	CV% < 3.0%

4.2.4.5 Demostración de Robustez para los diferentes tipos de métodos

Como se mencionó anteriormente, la finalidad de este tipo de estudios es la de demostrar si el método es afectado por variaciones pequeñas, pero deliberadas, en sus condiciones normales de operación. Adicionalmente, en muchos casos, se requiere la demostración de la estabilidad de la muestra analítica o de las soluciones de estándares, sobre todo cuando estos son de difícil disposición^{1, 4, 6-7}.

A partir de lo anterior, una propuesta general de protocolo resumido para la demostración de Robustez, que será aplicable para los diferentes métodos reseñados en este Capítulo, se presenta en la Tabla 4.12.

Tabla 4.12 Propuesta de protocolo resumido para la demostración de Robustez^{1, 6, 7}.

Parámetro de desempeño	Experimentos que pueden realizarse	Criterios de aceptación típicos
Robustez	Investigar con la aplicación de un diseño experimental adecuado si los factores críticos tienen un efecto en los resultados del método cuando se varían en niveles razonables para la operación normal del método	No debe haber factores que influyan significativamente en los resultados, o si existen, se controlan de manera adecuada
	Evaluar la estabilidad de las soluciones requeridas comparando las almacenadas con las preparadas originalmente. Seleccionar las condiciones de almacenamiento de forma casuística	Los resultados deben mantenerse en un intervalo razonable después del almacenamiento de las muestras

4.3 Planeación y ejecución del estudio de Validación¹³⁻¹⁵

Una vez que se cuenta con el protocolo de Validación, es posible acceder a la fase de planeación del estudio, de tal manera que este se lleve a cabo de la manera más eficiente. Para lograr dicho cometido, puede dividirse el procedimiento de planeación en:

- a. Análisis de tiempo y recursos necesarios.
- b. Determinación del orden de los experimentos a desarrollar.
- c. Ejecución del estudio.

4.3.1 Análisis de tiempo y recursos necesarios

Cada método y técnica analítica involucrada en el estudio tendrá particularidades que hay que considerar. No es lo mismo desarrollar un análisis volumétrico, que requiere la preparación de soluciones, pesadas, toma de alícuotas, mediciones y registro de resultados, a un método cromatográfico en el que existe un tiempo de corrida determinado y, en ocasiones, adicionalmente un tiempo de equilibrio del sistema y de lavado y reacondicionamiento posterior a la lectura de muestras. Debe considerarse el número de muestras a analizar en total y las que pueden analizarse por día de trabajo de manera correcta.

Independientemente del tipo de método a validar, **el protocolo de Validación permite hacer un recuento de todos los materiales necesarios, y buscar contar con ellos al 100% para evitar detener el estudio.**

4.3.2 Determinación del orden de los experimentos a realizar

Las soluciones que se preparan para demostrar un parámetro de desempeño pueden ser utilizadas para demostrar otro. Por ejemplo, las soluciones para determinar precisión pueden emplearse en estudios de Robustez y de estabilidad. Debe tenerse cuidado en que las muestras utilizadas para determinar Robustez no pueden utilizarse para determinar otros parámetros de la Validación.

Las soluciones para Exactitud y Linealidad pueden ser las mismas. Cuando no se cuenta con muestras reales para el estudio de precisión, pueden prepararse mezclas sintéticas que serán útiles tanto para el estudio de precisión como para la determinación de Exactitud.

Los estudios de Precisión Intermedia requieren en varias ocasiones que dos analistas preparen soluciones, reactivos, fases móviles, entre otros, lo que debe considerarse en el orden de los experimentos y en el tiempo de realización de los mismos.

4.3.3 Ejecución del estudio de Validación

Antes de iniciar el estudio, tal como se estableció en el Capítulo 2 de este libro, debe tenerse la documentación que avale que se trabaja con equipos calificados, instrumentos calibrados, estándares trazables a patrones establecidos, personal capacitado para la Validación y que se asegura en todo momento la integridad de los datos y resultados.

Debe establecerse, desde el protocolo, la forma de documentar los datos de Validación (registros) y asegurar la integridad de los mismos de acuerdo con el sistema documental del laboratorio.

4.4 Reporte de resultados de la Validación^{4, 14}

El reporte de Validación **tienen como objetivo detallar los resultados del estudio de Validación, siendo un medio de suma relevancia para contener la información relativa a las características de desempeño que fueron probadas, los resultados obtenidos y la interpretación de dichos resultados, arribando a una conclusión general.**

Un reporte de Validación puede contener, más no se restringe únicamente a:

- a. Los detalles ya establecidos en el protocolo de Validación (sección 4.1 de este libro).
- b. Los resultados que se obtuvieron para cada parámetro de desempeño del método.
- c. Una discusión o interpretación de los resultados.
- d. Cualquier información relevante obtenida durante el estudio y que pudiera considerarse que afecta el desempeño del método.
- e. Referencia a las bitácoras, carpetas, medios electrónicos o cualquier medio de soporte de los datos con los que se llegó a los resultados de Validación.

4.5 Resumen del Capítulo 4

- La documentación de la Validación se fundamenta en el Plan Maestro de Validación (PMV), que debe contener, dentro de muchos documentos, los Métodos Analíticos, con sus respectivos protocolos de Validación
- En un protocolo de Validación se harán explícitos aquellos aspectos que permitan cumplir, de manera total, los requisitos del plan de trabajo del estudio de Validación:
 - Los objetivos del estudio
 - Los procedimientos
 - Los métodos
 - Los criterios de aceptación
- Una vez que se cuenta con el protocolo de Validación, es posible acceder a la fase de planeación del estudio, de tal manera que este se lleve a cabo de la manera más eficiente
- Debe establecerse, desde el protocolo, la forma de documentar los datos de Validación (registros) y asegurar la integridad de los mismos de acuerdo con el sistema documental del laboratorio
- El reporte de Validación tienen como objetivo detallar los resultados del estudio de Validación, siendo un medio de suma relevancia para contener la información relativa a las características de desempeño que fueron probadas, los resultados obtenidos y la interpretación de dichos resultados, arribando a una conclusión general

4.6 Bibliografía del Capítulo 4

1. ICH Expert Working Group. Validation of analytical methods. Text and methodology Q2(R1) [Internet]. International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use; 2005 [citado 2016 Jun 28]. 13 p. Disponible en: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf.
2. Secretaría de Salud. Norma Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-2013, Buenas prácticas de fabricación de medicamentos. Ciudad de México: Secretaría de Salud; 2013.
3. Secretaría de Salud. Reglamento de insumos para la salud. México: Secretaría de Salud: Diario oficial de la Federación; 2014.
4. McPolin O. Validation of analytical methods for pharmaceutical analysis. Warrenport, Northern Ireland, United Kingdom: Mourne training services; 2009.
5. Comisión de Validación de Métodos Analíticos. Métodos Analíticos. Guía de Validación. Ciudad de México: Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biológicos México; 2002.
6. Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. 11a edición. México D.F: Secretaría de Salud; 2015.
7. Centro Nacional de Metrología. Métodos Analíticos adecuados a su propósito. Guía de laboratorio para la Validación de métodos y temas relacionados. Publicación técnica CNM-MRD-PT-030. 2ª edición. Los Cués, Querétaro, México: Centro Nacional de Metrología; 2005.
8. ICH Expert Working Group. Topic Q3A(R2): Impurities in New drug substances [Internet]. International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use; 2006 [citado 2016 Jun 28]. 13 p. Disponible en: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q3A_R2/Step4/Q3A_R2_Guideline.pdf.
9. ICH Expert Working Group. Impurities: Guideline for residual solvents. Q3C(R5) [Internet]. International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use; 2006 [citado 2016 Jun 28]. 13 p. Disponible en: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q3C/Step4/Q3C_R5_Step4.pdf.
10. ICH Expert Working Group. Topic Q3B(R2): Impurities in New drug products [Internet]. International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human

use; 2006 [citado 2016 Jun 28]. 13 p. Disponible en: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q3B_R2/Step4/Q3B_R2_Guideline.pdf

- 11.** Chaloner-Larsson G, Anderson G, Egan A. Guía de la OMS sobre los requisitos de las prácticas adecuadas de fabricación (PAF). Segunda parte: Validación. Programa mundial de vacunas e inmunización. Ginebra, Suiza: Organización Mundial de la Salud; 1998.
- 12.** Sección de laboratorio y asuntos científicos. Directrices para la Validación de Métodos Analíticos y la calibración del equipo utilizado para el análisis de drogas ilícitas en materiales incautados y especímenes biológicos. New York, USA: Oficina de las Naciones Unidas contra la droga y el delito; 2010.
- 13.** Stöckl D, D'Hondt H, Thienpont L. Method validation across the disciplines- critical investigation of major validation criteria and associated experimental protocols. *J Chromatography B*. 2009. 877:2180-90.
- 14.** González A, Herrador M. A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles. *Trends Anal Chem*. 2007; 26(3): 227-38.
- 15.** Ermer J, Miller J. Method validation in pharmaceutical analysis, a guide to best practice. New York: Wiley; 2005.



**Introducción a la validación de métodos analíticos
para el laboratorio farmacéutico de control de calidad.**

Primera edición. Editado por la FES Zaragoza de la UNAM. Av. Guelatao Núm. 66, Col. Ejército de Oriente, C.P. 09230, México, D.F. Se terminó de imprimir el 30 de marzo de 2017 en Grafitia, S.A. de C.V. Fuente de la Luna No. 131, Col. Fuentes del Pedregal, C.P. 14140, México, D.F.

Tel. 55 1685 6626. Para su composición se utilizó tipografía Arial de 9 puntos y Britannic Bold de 9/20 puntos. El tiraje consta de 500 ejemplares, impresos en offset a una tinta, encuadernado rústico, en papel bond blanco de 90 gramos y los forros de cartulina couché blanco importado de 250 gramos.

Formación y diseño: Claudia Ahumada Ballesteros.
Cuidado editorial: Vicente Jesús Hernández Abad

INTRODUCCIÓN A LA VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA EL LABORATORIO FARMACÉUTICO DE CONTROL DE CALIDAD

Vicente Jesús Hernández Abad

Elizabeth Guadalupe Sánchez González

Los medicamentos son los insumos para la salud que se utilizan de manera más frecuente por la población, y cuyo impacto en la calidad de vida de esta es mayor. Para que un medicamento sea puesto al alcance de las personas, debe cumplir con una serie de atributos normativos que permitan establecer con toda claridad su eficacia y seguridad de uso. Dentro de tales requisitos se encuentra el cumplimiento de especificaciones de control de calidad; la decisión sobre el cumplimiento o no de tales especificaciones se fundamenta siempre en los resultados de un análisis, que puede ser cuali o cuantitativo, tanto de los componentes como del desempeño del producto farmacéutico. El análisis siempre se realiza utilizando un método establecido, por lo que el conocer si el método es confiable y cumple con los objetivos para los que fue desarrollado es fundamental para la decisión que se toma a partir de la utilización del mismo. Para tener certeza de tal confiabilidad y utilidad, se lleva a cabo la Validación de los Métodos Analíticos (VMA). A la luz de todo lo mencionado, no es de extrañar que el concepto, los requisitos y la forma de reportar la VMA sean temas fundamentales en la formación del Químico Biólogo.

Ante la carencia de materiales enfocados a la enseñanza y el aprendizaje de la VMA, y con la idea de aportar un texto sencillo y ágil que fortalezca la enseñanza del tema, se presenta el libro Introducción a la validación de Métodos Analíticos para el Laboratorio farmacéutico de Control de Calidad, auspiciado en su totalidad por la Universidad Nacional Autónoma de México, a través de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (PAPIME PE-200815), con el convencimiento de que este texto permitirá mejorar la comprensión de los conceptos y servirá como una rápida referencia no solamente en la etapa formativa del estudiante, sino posteriormente en su ejercicio como profesional Farmacéutico.



Facultad de Estudios Superiores Zaragoza,
Campus I. Av. Guelatao No. 66 Col. Ejército de Oriente,
Campus II. Batalla 5 de Mayo s/n Esq. Fuerte de Loreto.
Col. Ejército de Oriente,
Iztapalapa, C.P. 09230 México D.F.
Campus III. Ex fábrica de San Manuel s/n,
Col. San Manuel entre Corregidora y Camino a Zautla,
San Miguel Conilla, Santa Cruz Tlaxcala.

<http://www.zaragoza.unam.mx>

