

INFORME FINAL DE SERVICIO SOCIAL

DATOS GENERALES Y MATRÍCULA

Mario Alberto García Martínez
Matrícula 2163026400

LUGAR Y PERIODO DE REALIZACIÓN

UAM Xochimilco del 16-Ago-2022 a 16-Feb-2023

UNIDAD, DIVISIÓN Y LICENCIATURA CURSADA

Unidad Xochimilco
División de Ciencias Biológicas y de la Salud — Departamento de Sistema Biológicos
Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica

NOMBRE DEL PROYECTO EXTERNO

Manual de Validación de Métodos Analíticos por CLAR conforme a la categoría I
descrita en la FEUM 13va edición

NOMBRE DE LA ASESORA

Dra. Karina Sánchez Herrera. NÚM. ECO: 29037



ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	3
2. JUSTIFICACIÓN	3
3. OBJETIVOS	3
General	3
Específicos	4
4. MARCO TEÓRICO	4
Validación del método analítico	4
Clasificación de métodos analíticos	5
Cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR)	6
Interpretación de un cromatograma	8
Aptitud del sistema	9
Buenas prácticas cromatográficas	9
Principios generales de buenas prácticas de laboratorio	11
Cálculos de resultados	12
Reactivos	12
Sustancias de referencia y materiales de referencia	12
Estándares secundarios	12
Hoja de trabajo analítico	13
5. DESARROLLO DE LA REVISIÓN	13
6. METODOLOGÍA	14
7. DISCUSIÓN	14
8. CONCLUSIÓN	15
9. REFERENCIAS	16

1. INTRODUCCIÓN

La validación consiste en una serie de experimentos rigurosamente controlados diseñados para demostrar que un procedimiento de medición dado producirá datos que se ajustan a su propósito previsto. Dicho de otra manera, se necesita comprender el propósito de la medición, describir cómo se realizará la medición y, finalmente, cómo se demostrará que la medición es aceptable. [7]

La validación de métodos analíticos es un proceso fundamental al momento de cuantificar con precisión los analitos en el análisis químico, siendo la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR) una de las principales técnicas analíticas ampliamente utilizada en los laboratorios analíticos, debido a su poderosa combinación de capacidades de separación y cuantificación.

Los documentos generados de una validación deben incluir los requisitos del método, los resultados de la validación, información sobre el equipo y material utilizado, es importante documentar los procedimientos de validación de métodos analíticos para producir resultados fiables y para dejar constancia por escrito de que se cumplen los requisitos evaluados.

El desarrollo y la validación de métodos analíticos implican una serie de actividades que están en curso durante el ciclo de vida de productos y sustancias farmacéuticas, con el objetivo de que la validación de un procedimiento analítico sea demostrar que es adecuado para su finalidad prevista. [15]

2. JUSTIFICACIÓN

Debido al desarrollo de la industria farmacéutica en el proceso de descubrimiento de fármacos que convergen en nuevos preparados farmacéuticos, los laboratorios de desarrollo y de control de calidad químico deben ser capaces de procesar y analizar mediante una amplia variedad de métodos de ensayo, con la finalidad de demostrar resultados analíticos confiables. Ya que, si el resultado de un análisis no es confiable, entonces tiene poco valor y el análisis puede mejor no llevarse a cabo.

En un requisito importante la demostración experimental de la idoneidad mediante la práctica de la medición analítica, en vista de que, los métodos analíticos utilizados para evaluar la calidad de los productos farmacéuticos (categoría I, II, III y IV), están sujetos a varios requisitos de acuerdo con la normativa vigente, así como con otros documentos normativos nacionales e internacionales [9, 16]. Por ello cuando se desarrolla un método analítico es necesario realizar la validación de éste, de manera que se pueda comprobar la confiabilidad en la obtención de resultados analíticos seguros.

3. OBJETIVOS

General

Elaborar un manual de Validación de Métodos Analíticos por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) conforme a la categoría I descrita en la FEUM 13va edición.

Específicos

- Describir la determinación de cada una de las características de desempeño analítico, de acuerdo con la categoría del método analítico correspondiente a su aplicación analítica.
- Establecer los criterios para llevar a cabo actividades de validación de métodos analíticos para cuantificar a un componente específico en muestras de preparados farmacéuticos.
- Detallar el análisis de datos mediante el procesamiento estadístico para cada una de las características de desempeño analítico.
- Elaborar formatos de presentación de un protocolo e informe de validación.
- Desarrollar diversos ejemplos prácticos y ejercicios de cada una de las características de desempeño analítico recomendados en la validación de métodos analíticos.

4. MARCO TEÓRICO

VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

La validación de un método es el proceso que establece, mediante estudios de laboratorio; que las características de desempeño del método satisfacen los requisitos para su aplicación analítica.

El proceso de validación de los métodos analíticos puede comprender, pero no está limitado al estudio de las características de desempeño que se describen en la “Tabla 1” conforme a FEUM ^[9], a su vez engloban las características analíticas típicas utilizadas para la validación de métodos descritas en las directrices de Q2(R1) ^[15] y el capítulo <1225> Validación de procedimiento compendiales ^[16], con el fin de brindar orientación sobre los parámetros de validación que deben cubrirse, sobre el alcance de la validación requerida y los procedimientos que deben seguirse para la validación de métodos analíticos.

Tabla 1. Características de desempeño analítico recomendadas en la validación de los métodos analíticos ^[9]

Verificación del sistema
Precisión del sistema
Linealidad del sistema
Especificidad/Selectividad
Exactitud del método
Linealidad e intervalo del método
Precisión del método
Límite de detección del método
Límite de cuantificación del método
Robustez del método
Tolerancia del método

El propósito de un método analítico escrito debe ser transmitir las instrucciones necesarias para permitir que un personal capacitado y calificado reproduzca fielmente los procedimientos y procesos de medición, aplique el método a la muestra y se establezcan los resultados con la confianza adecuada.

Los métodos analíticos son utilizados para evaluar la calidad de los productos farmacéuticos y están sujetos a varios requisitos de acuerdo con la normatividad vigente, así como con otros documentos normativos nacionales e internacionales.^[9] Por lo tanto, es esencial que los datos generados por un método analítico sean aptos para su propósito previsto en todo momento durante su ciclo de vida de uso.^[7]

La descripción del método puede incluir, entre otros, título, fundamento, objetivos, materiales, reactivos, instrumentos, características operacionales importantes, instrucciones específicas, tales como: pruebas de verificación, preparación de las muestras, uso de sustancias de referencia, soluciones, blancos utilizados; precauciones que deben tomarse en cuenta y las fórmulas explícitas para realizar los cálculos requeridos.^[9]

Clasificación de métodos analíticos

Los métodos analíticos para fines de validación se clasifican en cuatro categorías, ya que requieren de diferentes esquemas de estudio, como se describen en la “Tabla 2”.

Tabla 2. Características de desempeño analítico recomendadas para la validación de un método de acuerdo con su categoría ^[9]

Características de desempeño	Categoría I	Categoría II		Categoría III	Categoría IV
		Cuantitativas	Pruebas límite		
Verificación del sistema	*	*	*	*	NO
Precisión del sistema	SI	SI	*	*	NO
Linealidad del sistema	SI	SI	*	*	NO
Especificidad/Selectividad	SI	SI	SI	*	SI
Exactitud del método	SI	SI	*	*	NO
Linealidad del método	SI	SI	*	*	NO
Precisión del método	SI	SI	NO	SI	NO
Límite de detección	NO	NO	SI	*	NO
Límite de cuantificación	NO	SI	NO	*	NO
Tolerancia	*	*	*	*	*
Robustez	*	*	*	*	*

* Puede ser necesario dependiendo la naturaleza del método

Categoría I. Métodos analíticos para cuantificar a un componente en 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.) en muestras de fármacos, preparados farmacéuticos y aditivos. Estos métodos pueden incluir determinaciones cuantitativas o pruebas límite. En estas últimas, el interés es establecer si el analito, no excede o no, un valor límite. Los métodos de impureza quedan incluidos en esta categoría.

Categoría III. Métodos analíticos utilizados en la determinación de un analito en una muestra con el objeto de evaluar una característica de desempeño del preparado farmacéutico (disolución de cápsulas, liberación controlada en tabletas, entre otras).

Categoría IV. Pruebas de identificación de un analito en muestras de fármacos, aditivos o preparados farmacéuticos, cuyo propósito es establecer la presencia del analito de interés. ^[9]

CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN (CLAR)

La cromatografía es una técnica desarrollada a principios del siglo XX, que permite la separación de sustancias que se encuentran en una mezcla. En general, la cromatografía es un proceso de migración diferencial en el cual los componentes de una mezcla son transportados por una fase móvil (gas o líquido), y retenidos selectivamente por una fase estacionaria que puede ser un líquido o un sólido.

El éxito en la aplicación de la CLAR para la separación de una mezcla determinada depende de la combinación correcta de las condiciones de operación, es decir: la preparación de la muestra, características de la columna, de la fase móvil, el tipo de detección, el algoritmo de integración, etc.

La migración diferencial en el CLAR es resultado del equilibrio de distribución de los componentes de una mezcla entre la fase estacionaria y la fase móvil. Dichos componentes se separan en la columna y al salir de ésta son conducidos por la fase móvil, en el orden en que emergieron, hacia un detector donde se registra una respuesta proporcional a su cantidad sus concentraciones y sus tiempos de retención en la columna. El cromatograma resultante muestra cada compuesto que sale de la columna en forma de picos simétricos con un tiempo de retención característico por lo que este tiempo puede emplearse para identificar el compuesto. Este tiempo de retención se mide desde el momento de la inyección de la muestra hasta el momento en que aparece el máximo del pico en el cromatograma.

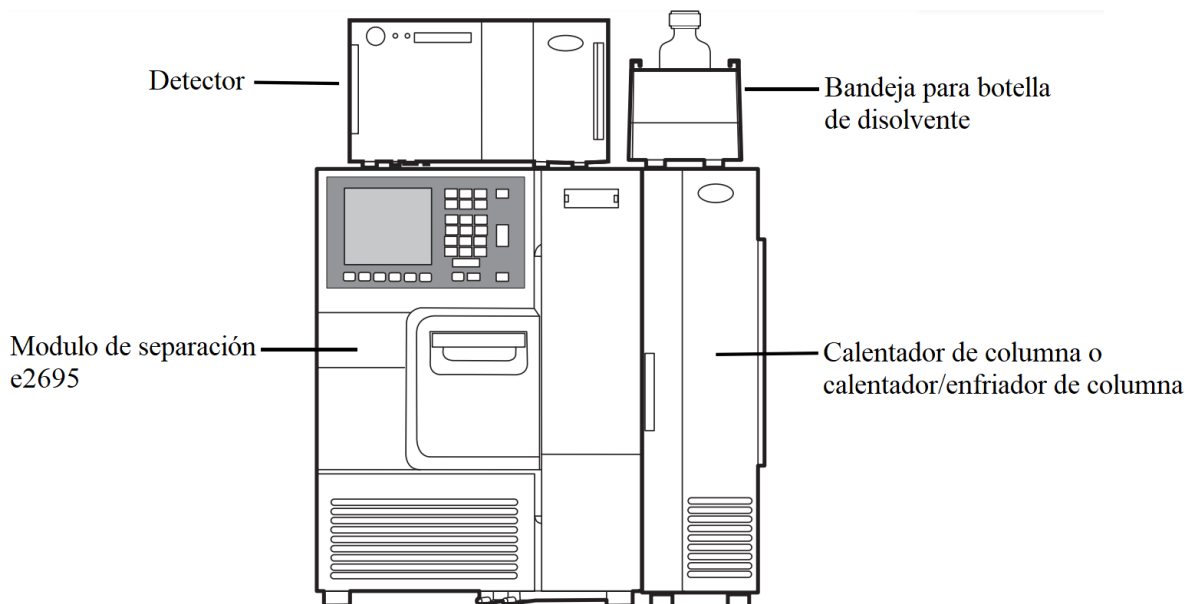
Los mecanismos o proceso de separación que dan como resultado la retención de las moléculas de muestra por parte de la fase estacionaria da lugar a los diferentes métodos de cromatografía líquida: fase reversa, fase normal, hidro-lipofílica, de intercambio iónico y de exclusión molecular. ^[9]

El proceso de elución consiste en un proceso de paso de un líquido en una cromatografía, consiste en la elución isocrática que usa un único disolvente como fase móvil y la elución en gradiente en la que la composición de la fase móvil varía progresivamente para aumentar la fuerza eluyente del disolvente. ^[2]

Esencialmente, un cromatógrafo de líquidos de alta resolución consta de las siguientes partes: sistema de bombeo, sistema de inyección, detector, columna, y registrador de señales. ^[9]

Figura 1

Configuración del sistema Serie C, empleado para cualquier sistema de HPLC Alliance



Nota. La figura representa a un cromatógrafo de líquidos de alta resolución, donde el sistema de bombeo y sistema de inyección corresponde al módulo de separación e2695, detector, el calentador/enfriador de columna, el registrador de señales se debe acoplar a un sistema computarizado de procesamiento de datos. Adaptado de Waters Corporation. (29 de julio de 2013). Waters Alliance e2695 Separations Module Operator Guide 715003794/Revision B. <https://www.waters.com/webassets/cms/support/docs/715003794rb.pdf>

Los siguientes puntos describen breves observaciones con la finalidad de tener un mejor sistema cromatográfico:

- Los pasos que hay que seguir para desarrollar un método son determinar la finalidad del análisis, seleccionar un método de preparación de muestra, elegir un detector, por ejemplo, un detector de fotodiodos se usa para registrar el espectro completo de UV de cada pico a medida que se eluye, de este modo es posible determinar qué compuesto corresponde a cada pico y usar un procedimiento sistemático para seleccionar el disolvente en una elución isocrática o en gradiente.
- Los atributos deseables de un nuevo método cromatográfico son una adecuada resolución de los analitos que interesan, rapidez y robustez (no estar afectado mucho por pequeñas variaciones de condiciones)
- Se preparan los amortiguadores acuosos para HPLC, y se ajusta el pH antes de mezclarlos con el disolvente orgánico.

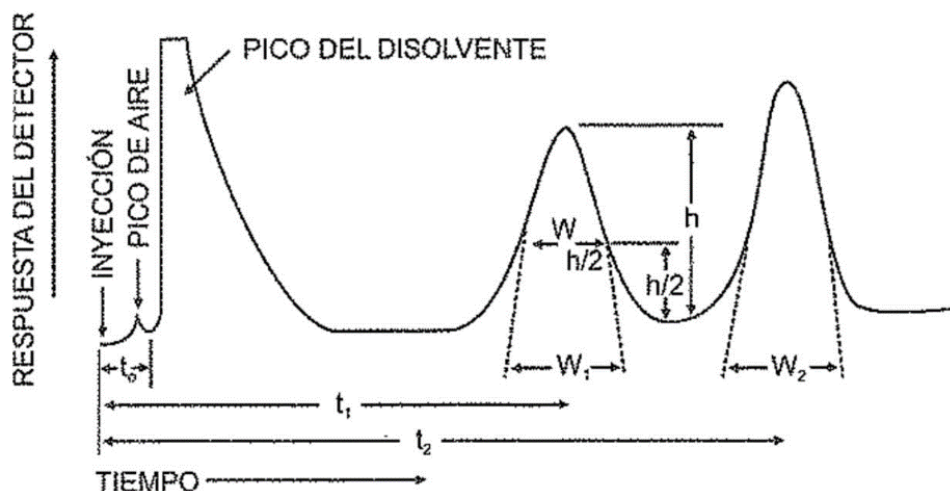
- El agua ultrapura para HPLC deber ser recién preparada con un aparato de purificación o por destilación. Al cabo de unas pocas horas, el agua ultrapura ya puede contener impurezas procedentes del polietileno y del vidrio del recipiente donde se guarda, [2] se recomienda filtrar a vacío mediante un sistema de filtración acoplado a membranas de celulosa regenerada o nylon de hasta 0.45 μm
- Se debe inyectar una mezcla estándar para evaluar el equipo de HPLC. Cuando cambia la forma de los picos o los tiempos de retención hay que pensar que existe un problema.
- Se debe filtrar las muestras a través de un filtro de 0.5 μm antes de inyectarlas, para que no se contamine la columna con partículas, no se obstruyan los conductos y no se dañe la bomba.
- Los primeros tres disolventes a estudiar en separaciones de fase inversa son, junto con el agua, acetonitrilo, metanol y tetrahidrofurano.
- Se puede optimizar una separación variando los disolventes, o usando un disolvente y la temperatura como las variables principales. Si se necesita mayor resolución, se puede disminuir el caudal, o se puede usar una columna más larga, o partículas de tamaño más pequeño. [2]

Interpretación de un cromatograma

Un cromatograma es una gráfica que representa la variación de la respuesta del detector acoplado al cromatógrafo en función del tiempo. La Figura 2 representa un cromatograma típico de elución de dos sustancias donde t_1 y t_2 son los tiempos de retención de las sustancias 1 y 2; h y $h/2$ son la altura total y la mitad de la altura del pico desde el ápice hasta la línea base; $W_{h/2}$ es el ancho del pico a la mitad de la altura; W_1 y W_2 son los anchos de las bases del pico 1 y 2, respectivamente y t_0 es el tiempo muerto y corresponde al tiempo de retención para una sustancia que no es retenida por la columna. [9]

Figura 2

Separación cromatográfica de dos sustancias.



Nota. Adaptado de *Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM)* 13va Edición (p. 325); 2021. Secretaría de Salud, Comisión permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos.

Aptitud del sistema

Cuando se indiquen los términos “Verificación del sistema” se entenderá como “Aptitud del sistema”.

El buen funcionamiento de un sistema cromatográfico (líquidos) se verá reflejado en la calidad del análisis. Es necesario considerar por esta razón todos los componentes del sistema (columna, velocidad de flujo, temperatura de operación, entre otros) para obtener resultados óptimos.

Es conveniente preparar una curva de calibración a concentraciones adecuadas (se recomienda al menos 5 niveles de concentración, considerando el intervalo de las concentraciones esperadas del analito o su especificación, por ejemplo: 120 %, 100 %, 80 %, 60 % y 40 %), a las condiciones especificadas para el fármaco en análisis, así como inyectar blancos para poder detectar alguna posible interferencia.

Las especificaciones de la columna y los parámetros del instrumento en la monografía correspondiente no excluyen otras condiciones de operación adecuadas. Las variaciones normales del equipo y en los materiales pueden requerir ajustes de las condiciones experimentales para obtener una operación aceptable.

Para asegurar la efectividad del sistema, es necesario someterlo a una prueba antes de utilizarse. La esencia de este tipo de pruebas es el concepto de que el equipo en general, las partes electrónicas, las operaciones analíticas y la muestra, constituyen un sistema analítico completo en el cual puede someterse a una prueba general de funcionamiento de sistema.

Se pueden obtener datos específicos de inyecciones repetidas no menos de seis inyecciones de una preparación ya sea de la muestra, de la Sustancia de referencia (SRef) o del estándar interno.

Estos datos pueden ser comparados con valores máximos y mínimos especificados tales como eficiencia, precisión interna, resolución, tiempo de retención, naturales de la curva de calibración, respuesta y recobros (entre otros parámetros), de acuerdo con lo especificado en las monografías individuales.

El parámetro más útil es la reproducibilidad de inyecciones repetidas de la solución analítica mezclada con la solución de estándar interno, preparadas a partir de la SRef como se indica en la monografía individual.^[9]

Buenas prácticas cromatográficas

1) Retención cromatográfica

Ya que la función de cromatografía es separar los componentes de una mezcla, es necesario garantizar que existe una adecuada retención de los compuestos a separar con la fase estacionaria, para que se logre dicha separación. Un parámetro que mide la calidad de dicha interacción es el factor de capacidad cromatográfico (k'), el cual se calcula con la siguiente fórmula:

$$k' = (t_{\alpha} - t_0) / t_0$$

Donde:

t_{α} = Tiempo de retención del primer pico en eluir.

t_0 = Tiempo muerto de la columna (corregido por la velocidad de flujo de trabajo)

Se recomienda que para métodos farmacopeicos, el factor de capacidad $k' > 1.5$.

II) Factor de coleo.

Algunas veces es útil saber un factor coleo para limitar el máximo permisible con la relación a la asimetría del pico (véase figura 2). Para propósitos farmacopeicos, el factor de coleo (T), se define como la relación de la distancia del ancho del pico, $W_{0.05}$, dividido entre $2f$ dividido entre dos veces la distancia, f , del máximo del pico hacia el lado izquierdo del pico. Estas distancias deben medirse a un punto que corresponda a un 5 % de la altura partiendo de la línea base.

Para un pico simétrico el factor de coleo es una unidad y el valor del factor de coleo (T) aumenta conforme el coleo va siendo más pronunciado.

El cálculo de expresa por la siguiente fórmula y la Figura 3:

$$\text{Factor de coleo} = T = W_{0.05} / 2f$$

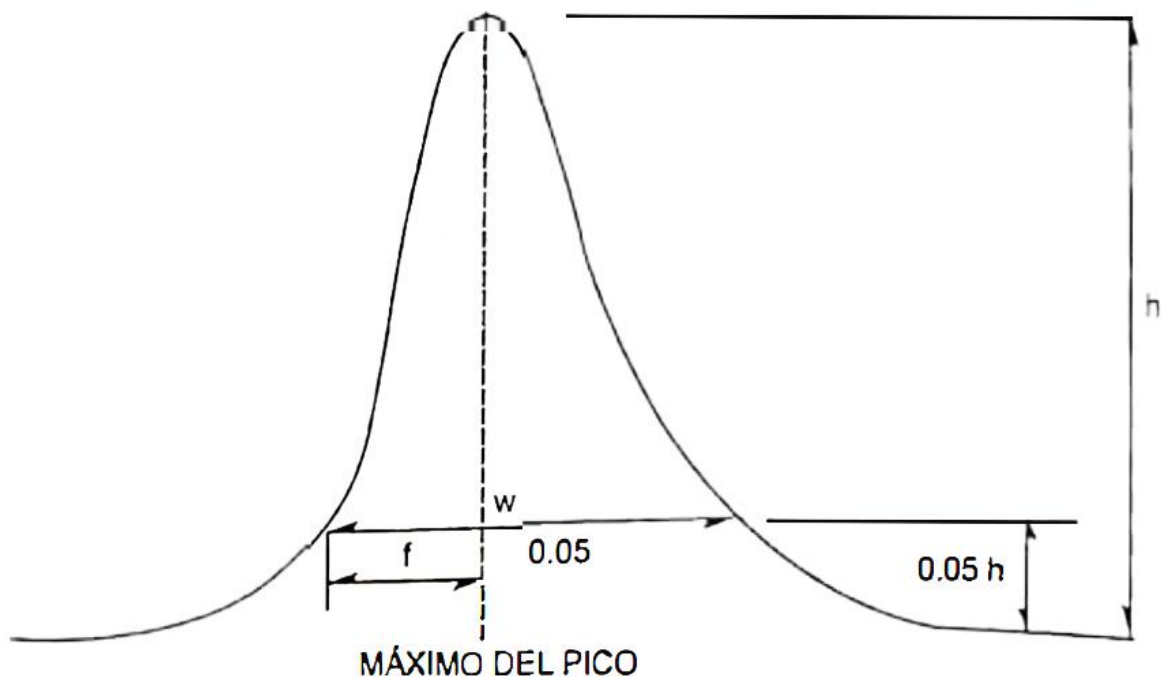
Donde:

$W_{0.05}$ = Relación de la distancia del ancho del pico.

f = Distancia del máximo del pico hacia el lado izquierdo del pico.

Figura 3

Pico cromatográfico asimétrico



Nota. Tomado de *Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM)* 13va Edición; 2021 (p. 326). Secretaría de Salud, Comisión permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos.

Se recomienda que el factor de coleo (T) < 2.0 (a menos que la cromatografía especifique algo diferente), y que este no va aumentando a lo largo del análisis.

III) Platos teóricos

Una medida de eficiencia de una columna en partículas se puede conocer calculando el número de platos teóricos (N) en la columna con la siguiente fórmula:

$$N = 16(t/W)^2$$

Donde:

t = Tiempo de retención de la sustancia.

W = Ancho de la base del pico obtenido extrapolando los lados del pico hasta la línea base, en las mismas unidades que t .

El valor de N es dependiente de la sustancia que está siendo analizada y de las condiciones de operación tales como la velocidad de flujo, la temperatura, la cantidad de empaque de la columna y la uniformidad de éste. Es recomendable determinar N desde el inicio del análisis y monitorear su valor hasta un mínimo permitido previamente, ya que una disminución de platos teóricos es un indicio del deterioro de la columna.

IV) Resolución cromatográfica

Como una medida de la eficiencia de la separación de dos componentes en una mezcla, objetivo final de la cromatografía, la resolución (R) se determina por la siguiente fórmula:

$$R = 2[(t_2 - t_1)/(W_2 + W_1)]$$

Donde:

t_2 y t_1 = Tiempos de retención para los componentes.

W_2 y W_1 = Anchos correspondientes de las bases de los picos obtenidos extrapolando los lados de los picos hasta la línea base

El factor de resolución (R) es importante para asegurar la separación de dos componentes que eluyen muy cercano uno del otro y para establecer la eficiencia del sistema.

Es recomendable que $R > 2$, a menos que se especifique un valor diferente en la monografía individual. ^[9]

PRINCIPIOS GENERALES DE BUENAS PRÁCTICAS DE LABORATORIO

Cálculo de resultados

Los cálculos de las pruebas deben ajustarse según la cantidad de la muestra tomada, pesada exactamente.

Los resultados de las pruebas y ensayos deben calcularse a una cifra decimal más que la indicada en los requisitos y después redondeada hacia arriba o abajo como sigue:

- Si la última cifra decimal calculada es de 5 a 9, el número anterior aumenta en 1.
- Si es menor, se deja el número anterior. ^[9]

Reactivos

Todos los reactivos químicos, incluyendo disolventes y materiales utilizados en los análisis, deberán ser de la calidad y grado conveniente para su uso (para fines prácticos del presente manual se recomienda utilizar reactivos líquidos grado HPLC). Los reactivos se adquieren con proveedores aprobados, los cuales entregarán un certificado de análisis y hoja de seguridad, cuando corresponda.

En el método se debe explicar el grado de cualquier reactivo crítico (inclusive el agua), junto con las precauciones de preparación, almacenaje y uso: toxicidad, inflamabilidad, estabilidad al calor, aire y luz, reacción con otras sustancias químicas y en ciertos contenedores y otros riesgos. Los reactivos y otros materiales de referencia preparados deben estar etiquetados para identificar la sustancia, su disolvente, cualquier precaución especial o riesgo, restricciones de uso, fecha de preparación y de caducidad y el responsable de prepararlos.

En la preparación de disoluciones reactivo, se siguen los procedimientos marcados en las publicaciones farmacopeicas o en otra información disponible.

Cuando la calidad de un reactivo sea crítica para un análisis, la calidad de un nuevo lote deberá ser comprobada con el lote anterior, siempre que éste, todavía se encuentre vigente.

Inspección visual. Todos los contenedores de reactivos deberán ser inspeccionados visualmente, no se deberán utilizar soluciones y reactivos deteriorados o caducos.

Agua. El agua se considera un reactivo. Se deberá utilizar el grado apropiado para el análisis específico, como lo describen las farmacopeas y otras normas oficiales de calidad.

Desecho. Los reactivos se desechan siguiendo las normas nacionales de seguridad y protección al medio ambiente. ^[9]

Sustancias de referencia y materiales de referencia

Las sustancias de referencia (primarias o secundarias), se utilizan durante el análisis de una muestra. Se deben utilizar sustancias de referencia farmacopeicas siempre que estén disponibles y que sean apropiadas para el análisis. Cuando no se cuente con una sustancia de referencia farmacopeica, el fabricante podrá establecer su propia sustancia de referencia, siempre que sea adecuadamente caracterizada de acuerdo con recomendaciones establecidas por la OMS.

Deberá procurarse que los materiales de referencia sean trazables al Sistema Internacional de Unidades, siempre que sea posible. ^[9]

Estándares secundarios

Los estándares de medición pueden ser primarios o secundarios, y los patrones secundarios se establecen a través de la calibración con respecto a un patrón de medición primario para una cantidad del mismo tipo. ^[17] El establecimiento de una sustancia química de referencia secundaria, calibrada frente a una sustancia estándar de referencia primaria, puede ser deseable por varias razones prácticas, el patrón primario puede no estar disponible en cantidades adecuadas para satisfacer todas las necesidades. Además, la disponibilidad de tales sustancias químicas secundarias de referencia (por ejemplo, a nivel regional) reduciría el costo y la demora en recibir el material de referencia. ^[19]

Hoja de trabajo analítico

La hoja de trabajo analítico puede ser una forma o formato impreso, un cuaderno de bitácora o un medio electrónico establecido internamente para que el analista registre la información de la muestra, reactivos y disolventes usados, métodos, cálculos y resultados de las pruebas, así como observaciones o información relevante. Se complementa con los datos crudos obtenidos. La hoja de trabajo analítico contiene evidencias documentales para confirmar que la muestra se examina siguiendo los requisitos o para soportar que un resultado quede fuera de especificaciones.

Se debe utilizar una hoja de trabajo para cada muestra o grupo de muestras, pero se conservan juntas las hojas de diferentes unidades referidas a la misma muestra.

Las cifras obtenidas en las pruebas, incluyendo los resultados del blanco, se vacían inmediatamente en las hojas de trabajo. Los datos graficados, con la anotación de si se obtuvieron del instrumento o si se graficaron a mano, deben anexarse o rastrearse al archivo electrónico o documento en el que se encuentren los datos. Las hojas de trabajo analítico llevan las firmas de los analistas encargados y del supervisor que aprueba los estudios.

Cuando se comete un error en las hojas de trabajo analítico o cuando hay que corregir datos o textos, la información anterior se cancela con una línea (no se borra ni se hace ilegible) y la nueva información se agrega a un lado. Todas las alteraciones deben ser firmadas y fechadas por la persona que hace la corrección. En la misma hoja se inscribe también el motivo del cambio.

En el caso de las especificaciones oficiales, se debe contar versión más reciente de la farmacopea nacional o la que corresponda según sea el caso.

Las solicitudes de prueba y las hojas de trabajo analítico se guardan en un lugar seguro, junto con todos los anexos, incluyendo cálculos y registros del análisis instrumental. ^[9]

5. DESARROLLO DE LA REVISIÓN

Se presenta el siguiente contenido:

*Manual de Validación de Métodos Analíticos por CLAR conforme a la categoría I descrita en la FEUM
13va edición*

El cual consta en los siguientes apartados:

- Capítulo 1. Generalidades.
- Capítulo 2. Protocolo de validación de métodos analíticos.
- Capítulo 3. Evaluación de las características de desempeño analítico.
- Capítulo 4. Informe de validación de métodos analíticos.
- Capítulo 5. Ejercicios prácticos de una validación de métodos analíticos.
- Apéndices.

Manual de Validación de Métodos Analíticos por CLAR
conforme a la categoría I descrita en la FEUM 13va edición

Contenido

CAPÍTULO 1. GENERALIDADES	I
ACERCA DE ESTE MANUAL	II
ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	III
GLOSARIO DE TÉRMINOS	V
LINEAMIENTOS GENERALES DE LAS CARACTERÍSTICAS DE DESEMPEÑO ANALÍTICO	VIII
<i>Verificación del sistema (Aptitud del sistema)</i>	<i>VIII</i>
<i>Precisión del sistema</i>	<i>VIII</i>
<i>Linealidad del sistema</i>	<i>VIII</i>
<i>Especificidad/selectividad del método</i>	<i>VIII</i>
<i>Exactitud del método</i>	<i>VIII</i>
<i>Linealidad e intervalo del método</i>	<i>VIII</i>
<i>Precisión del método</i>	<i>IX</i>
<i>Límite de detección del método</i>	<i>IX</i>
<i>Límite de cuantificación del método</i>	<i>IX</i>
<i>Tolerancia del método</i>	<i>IX</i>
<i>Robustez del método</i>	<i>IX</i>
<i>Revalidación</i>	<i>X</i>
CAPÍTULO 2. PROTOCOLO DE VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS	XI
DESCRIPCIÓN DE UN PROTOCOLO DE VALIDACIÓN	XII
CAPÍTULO 3. EVALUACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS DE DESEMPEÑO ANALÍTICO	XIV
PREPARACIÓN DE MUESTRAS	XV
CÁLCULO DEL PORCENTAJE DE RECOBRO	XV
DESCRIPCIÓN DE UNA VALIDACIÓN DE CUANTIFICACIÓN POR CLAR	XVI
VERIFICACIÓN DEL SISTEMA PARA MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS (APTITUD DEL SISTEMA)	XVII
<i>Determinación de verificación del sistema</i>	<i>XVII</i>
<i>Análisis de datos de verificación del sistema</i>	<i>XVII</i>
<i>Criterios de aceptación de verificación del sistema</i>	<i>XVII</i>
<i>Ejemplo práctico de verificación del sistema (Aptitud del sistema)</i>	<i>XVII</i>
PRECISIÓN DEL SISTEMA	XXII
<i>Determinación de precisión del sistema</i>	<i>XXII</i>
<i>Análisis de datos de precisión del sistema</i>	<i>XXII</i>
<i>Criterio de aceptación de precisión del sistema</i>	<i>XXII</i>
<i>Ejemplo práctico de precisión del sistema</i>	<i>XXII</i>
LINEALIDAD DEL SISTEMA	XXIV
<i>Determinación de linealidad del sistema</i>	<i>XXIV</i>
<i>Análisis de datos de linealidad del sistema</i>	<i>XXIV</i>

<i>Criterios de aceptación de linealidad del sistema</i>	XXIV
<i>Ejemplo práctico de linealidad del sistema</i>	XXIV
ESPECIFICIDAD/SELECTIVIDAD	XXVIII
<i>Determinación de especificidad</i>	XXVIII
<i>Determinación de selectividad</i>	XXVIII
<i>Análisis de datos de especificidad/selectividad</i>	XXIX
<i>Criterios de aceptación especificidad/selectividad</i>	XXIX
<i>Ejemplo descriptivo de especificidad/selectividad</i>	XXIX
EXACTITUD DEL MÉTODO	XXXIV
<i>Determinación de la exactitud en los métodos analíticos comprendidos en la categoría I...</i> XXXIV	
<i>Análisis de datos de exactitud del método</i>	XXXIV
<i>Criterios de aceptación de exactitud del método</i>	XXXIV
<i>Ejemplo práctico de exactitud del método</i>	XXXIV
LINEALIDAD E INTERVALO DEL MÉTODO	XXXVII
<i>Determinación de linealidad e intervalo del método</i>	XXXVII
<i>Análisis de datos de linealidad e intervalo del método</i>	XXXVII
<i>Criterios de aceptación de linealidad e intervalo del método</i>	XXXVII
<i>Ejemplo práctico de linealidad e intervalo del método</i>	XXXVIII
PRECISIÓN DEL MÉTODO	XLIV
<i>Determinación de repetibilidad</i>	XLIV
<i>Análisis de datos de repetibilidad</i>	XLIV
<i>Criterios de aceptación de repetibilidad</i>	XLIV
<i>Determinación de reproducibilidad intralaboratorio (Precisión intermedia)</i>	XLIV
<i>Análisis de datos de reproducibilidad intralaboratorio (Precisión intermedia)</i>	XLIV
<i>Criterios de aceptación de reproducibilidad intralaboratorio (Precisión intermedia)</i>	XLV
<i>Ejemplo práctico de precisión del método</i>	XLV
TOLERANCIA DEL MÉTODO	XLIX
<i>Determinación de tolerancia del método</i>	XLIX
<i>Análisis de datos de tolerancia del método</i>	XLIX
<i>Criterio de aceptación de tolerancia del método</i>	XLIX
<i>Ejemplo práctico de tolerancia del método</i>	XLIX
ROBUSTEZ DEL MÉTODO	LII
<i>Determinación de la investigación de tres factores como máximo</i>	LII
<i>Análisis de datos de la investigación de tres factores como máximo</i>	LII
<i>Criterio de aceptación de investigación de tres factores como máximo</i>	LII
<i>Determinación, análisis y ejemplo práctico de la investigación de cuatro a siete factores...</i> LVII	
<i>Criterio de aceptación de la investigación de cuatro a siete factores</i>	LXIV
ESTABILIDAD DE LA MUESTRA ANALÍTICA	LXV
<i>Determinación de la estabilidad analítica</i>	LXV
<i>Análisis de datos de la estabilidad analítica</i>	LXV

<i>Criterio de aceptación de la estabilidad analítica</i>	LXV
<i>Ejemplo de estabilidad analítica</i>	LXV
LÍMITE DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL MÉTODO	LXIX
<i>Determinación para métodos instrumentales basado en la señal ruido</i>	LXIX
<i>Análisis de datos para métodos instrumentales basado en la señal ruido</i>	LXIX
<i>Criterio de aceptación para métodos instrumentales basado en la señal ruido</i>	LXX
<i>Ejemplo de límite de detección y cuantificación basado en la señal ruido.</i>	LXX
<i>Determinación para métodos instrumentales basado en linealidad</i>	LXXI
<i>Análisis de datos para métodos instrumentales basado en linealidad</i>	LXXI
<i>Criterios de aceptación para métodos instrumentales basado en linealidad</i>	LXXII
<i>Ejemplo práctico del límite de detección y cuantificación basado en linealidad</i>	LXXII
INCERTIDUMBRE	LXXIX
CAPÍTULO 4. INFORME DE VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS	LXXX
DESCRIPCIÓN DE UN INFORME DE VALIDACIÓN	LXXXI
CAPÍTULO 5. EJERCICIOS PRÁCTICOS DE UNA VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS ..	LXXXIII
EJERCICIOS PRÁCTICOS DE LAS CARACTERÍSTICAS DE DESEMPEÑO ANALÍTICO	LXXXIV
<i>Verificación del sistema (Aptitud del sistema)</i>	LXXXIV
<i>Precisión del sistema</i>	LXXXV
<i>Linealidad del sistema</i>	LXXXVI
<i>Especificidad</i>	LXXXVIII
<i>Estabilidad analítica</i>	XC
<i>Exactitud del método</i>	XCI
<i>Linealidad e intervalo del método</i>	XCIII
<i>Precisión del método</i>	XCV
<i>Tolerancia del método</i>	XCIX
<i>Robustez del método</i>	CI
<i>Límite de detección</i>	CVI
<i>Límite de cuantificación</i>	CVIII
APÉNDICES	CX
APÉNDICE 1. TABLA A. FÓRMULAS ESTADÍSTICAS	CXI
APÉNDICE 2. TABLA B. VALORES CRÍTICOS DE LA DISTRIBUCIÓN CON $\alpha = 0.05$	CXIV
APÉNDICE 3. TABLA C. ESTADÍSTICA DE LA DISTRIBUCIÓN T DE STUDENT	CXV
APÉNDICE 4. USO DEL ANÁLISIS DE DATOS PARA EXCEL 365	CXVI
<i>Activación de la Herramienta de análisis de datos</i>	CXVI
<i>Instrucciones de uso para ANOVA de un factor</i>	CXVI
<i>Instrucciones de uso de Regresión</i>	CXVI
APÉNDICE 5. RESULTADOS DE LOS EJERCICIOS PRÁCTICOS	CXVII

<i>Verificación del sistema (Aptitud del sistema)</i>	<i>CXVII</i>
<i>Precisión del sistema</i>	<i>CXVII</i>
<i>Linealidad del sistema</i>	<i>CXVII</i>
<i>Especificidad</i>	<i>CXVII</i>
<i>Estabilidad analítica</i>	<i>CXVIII</i>
<i>Exactitud del método</i>	<i>CXVIII</i>
<i>Linealidad e intervalo del método</i>	<i>CXVIII</i>
<i>Precisión del método</i>	<i>CXIX</i>
<i>Tolerancia del método</i>	<i>CXX</i>
<i>Robustez del método</i>	<i>CXX</i>
<i>Límite de detección</i>	<i>CXXI</i>
<i>Límite de cuantificación</i>	<i>CXXII</i>

Capítulo 1. Generalidades

Acerca de este manual

Este manual se divide en los siguientes capítulos:

Capítulo 1. Generalidades.

Capítulo 2. Protocolo de validación de métodos analíticos.

Capítulo 3. Evaluación de las características de desempeño analítico.

Capítulo 4. Informe de validación de métodos analíticos.

Capítulo 5. Ejercicios prácticos de una validación de métodos analíticos.

Apéndices.

Abreviaturas y símbolos

% — Porcentaje.

% R — Porcentaje de recobro.

|di| — Diferencia absoluta porcentual de la media aritmética.

° C — Grados centígrados.

a — Ordenada al origen.

AU — Unidad de absorbancia del valor integrado del área del pico, también expresado como AU*min.

b — Pendiente.

C_A, C_B, C_C, C_D, C_E, C_F, C_G — Contrastes de factores.

CC — Curva de calibración.

CV — Coeficiente de variación.

CV_{y/x} — Coeficiente de variación de regresión.

F_{cal} — Valor F calculado de la distribución de Fisher.

FEUM — Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos.

F_{tab} — Valor F de tablas de la distribución de Fisher.

gl_e — Grados de libertad.

HPLC — High Performance Liquid Chromatography.

IC(μ) — Intervalo de confianza para la media poblacional.

IC(β₀) — Intervalo de confianza de la ordenada al origen.

IC(β₁) — Intervalo de confianza para la pendiente.

k' — Factor de capacidad cromatográfico.

LC — Límite de Cuantificación.

LD — Límite de Detección.

M — Concentración de molaridad.

MC_e — Media de cuadrados del error.

mg — Miligramo.

mL — Mililitro.

N — Concentración de normalidad.

N — Platos teóricos.

R — Resolución cromatográfica.

r² — Coeficiente de determinación.

s — Desviación estándar.

s_a — Desviación estándar de la ordenada al origen.

SC_{CA} , SC_{CB} , SC_{CC} , SC_{CD} , SC_{CE} , SC_{CF} , SC_{CG} : Suma de cuadrados del error de los contrastes de factores.

SC_e — Suma de cuadrados del error.

s_e — Medida de error de la respuesta analítica.

s_w — Desviación estándar de blancos o matrices analíticas no adicionadas de analito.

$s_{y/x}$ — Desviación estándar de la regresión.

T — Factor de coileo.

\bar{x} — Promedio aritmético.

$y_1, y_2, y_3, y_4, y_5, y_6, y_7, y_8$ — Resultados de corridas analíticas de factores.

α — Nivel de significancia.

Glosario de términos

Analito — Componente específico de una muestra, a medir en un análisis. ^[4]

Blanco de muestra — Son matrices que no contienen el analito de interés. Son difíciles de obtener, pero son necesarios para estimar las interferencias que pudieran encontrarse durante el análisis de las muestras de prueba. ^[4]

Blanco de reactivos — Reactivos usados durante el proceso analítico (incluyendo los disolventes usados en la extracción o disolución) los cuales son analizados para garantizar que la medición no es influenciada por los materiales utilizados durante el análisis. ^[4]

Criterios de aceptación — Parámetros bajo los cuales el resultado de una prueba será considerado aceptable. ^[4]

Diseño de Placket Burman para estudios de robustez — Es un diseño experimental también denominado factorial fraccionado saturado; permite investigar el efecto lineal de n-1 factores o menos, a partir de n corridas experimentales; donde investigar el efecto de cualquier factor siempre se emplean dos niveles (alto y bajo). Estos diseños pueden ser utilizados en la validación de métodos analíticos para investigar la robustez del método a factores, en los cuales la variación de los niveles sea de magnitud pequeña, pero deliberada; en términos de la corrida analítica.

El cambio pequeño y deliberado en la corrida analítica, de acuerdo con los ejemplos mostrados del numeral 6. Anexo A, correspondiente al Apéndice III. Validación de métodos analíticos. Recomendaciones para su presentación ante la FEUM 13va edición, se interpreta un $\pm 5\%$ para los niveles altos y bajos respecto al nivel normal de operación para el diseño del experimento de robustez del método. Es importante que se interprete el concepto de “cambio pequeño y deliberado en la corrida analítica” por parte del analista que lleve a cabo el diseño del experimento. Mientras que, *el cambio deliberado, pero no pequeño a nivel de la corrida analítica*, se interpreta un intervalo de ± 20 a 50% para los niveles altos y bajos respecto al nivel normal de operación para el diseño del experimento de robustez del método. ^[9]

Especificidad/Selectividad del método — Es la capacidad de un método analítico para obtener una respuesta debida únicamente al analito de interés y no a otros componentes de la muestra, que pueden estar presentes (especificidad) o que se pudieran presentar por efectos ambientales y/o de interacción con los mismos componentes (selectividad) tales como: impurezas, productos de degradación o componentes de la misma muestra. ^[9]

Exactitud del método — Es la concordancia absoluta entre el resultado obtenido con el método y la cantidad verdadera del analito presente en la muestra, a una cantidad fija. ^[9]

Incertidumbre — Parámetro no negativo que caracteriza la dispersión de los valores atribuidos a un mensurando, a partir de la información que se utiliza. ^[4]

Intervalo — Es el intervalo comprendido entre las concentraciones superior e inferior del analito (incluyendo dichas concentraciones) y para el que se ha demostrado que el analito es cuantificado con un nivel satisfactorio de precisión, exactitud y linealidad, cuando se aplica al método analítico. ^[9]

Límite de cuantificación — Es la cantidad mínima de un analito en una muestra que puede ser determinada con exactitud y precisión aceptable, bajo las condiciones de aplicación del método. Las unidades del límite se expresan como se indica en el método analítico (por ejemplo, porcentaje, ppm, ppb, mg/g, etc.). [9]

Límite de detección — Es la cantidad mínima de analito en una muestra que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, bajo las condiciones de aplicación del método. Así las pruebas límite solamente indican que la cantidad de analito es superior o inferior a la concentración establecida. El límite de detección se expresa generalmente como la concentración indicada en el método analítico (por ejemplo, porcentaje, ppm, ppb, mg/g, etc.). [9]

Linealidad del sistema — Es la verificación de que la respuesta analítica y la concentración del analito (puede ser una sustancia de referencia) se ajustan al modelo matemático, en un intervalo de concentraciones pertinentes a la aplicación analítica. [9]

Linealidad — Es la capacidad de un método analítico para dar resultados que son directamente proporcionales a la concentración del analito (sin sesgo) dentro de un intervalo dado. [9]

Método analítico — Descripción de la secuencia de actividades, recursos materiales y parámetros que se deben cumplir, para llevar a cabo el análisis de un componente específico de la muestra. [3]

Método no normalizado — Método alternativo que demuestra o estima el mismo analito tal cual se mide utilizando el método normalizado. [4]

Método normalizado — Proceso de medición robusto donde pequeñas variaciones en el procedimiento no deben producir de forma imprevista grandes variaciones en los resultados. [4]

Muestra adicionada — Porción representativa del material a evaluar, a la que se le adicionan cantidades conocidas del analito de interés. [4]

Placebo adicionado — Muestra de un placebo analítico al cual se le adiciona una cantidad conocida del analito. [3]

Placebo analítico — Muestra que contiene todos los componentes de un producto a excepción del analito. [3]

Porcentaje de recobro — Cociente porcentual de la concentración recuperada entre la condición adicionada. [9]

Precisión del método — Es el grado de concordancia relativa entre los resultados obtenidos al aplicar el método analítico, bajo las mismas condiciones analíticas (repetibilidad) o bajo diferentes condiciones analíticas (reproducibilidad), utilizando una muestra homogénea. La precisión de un método analítico generalmente se expresa como la desviación estándar o como el coeficiente de variación (desviación estándar relativa). [9]

Precisión del sistema — Es el grado de concordancia relativa de la respuesta analítica de soluciones de referencia o magnitud conocida. [9]

Precisión intermedia — Expresa la variación dentro de un mismo laboratorio, cuando el método analítico se aplica en diferentes días y con diferentes analistas (condiciones de precisión intermedia). ^[9]

Repetibilidad — Se refiere a la variación de los resultados de las muestras, al aplicar el método en una corrida analítica. La repetibilidad es una propiedad crítica del método analítico porque mide la variación del método analítico en la rutina de trabajo. ^[9]

Respuesta analítica — Lectura obtenida al aplicar un método analítico, como pueden ser el área o altura del pico de un cromatograma, lectura de absorbancia, cuentas de iones en un espectro de masas, lectura en mV, mL gastados en volumetría, diferencia de peso en un gravimétrico, entre otros. ^[4]

Robustez — Capacidad del método analítico de mantener su desempeño al presentarse variaciones pequeñas pero deliberadas, en la característica normales de operación del método. ^[9]

Tolerancia — Es el grado de reproducibilidad de los resultados de prueba obtenidos por el análisis de la misma muestra, bajo una variabilidad de condiciones tales como: diferentes laboratorios, analistas, instrumentos, lotes de reactivos, días, etc. ^[9]

Verificación del sistema — Son pruebas utilizadas para verificar que el sistema funciona correctamente, con base en criterios establecidos previamente. Esta prueba permite establecer la confiabilidad del sistema, antes del procesamiento de las muestras durante el uso rutinario del método; también se le conoce como buen o correcto funcionamiento del sistema. ^[9]

Lineamientos generales de las características de desempeño analítico

Verificación del sistema (Aptitud del sistema)

Si las mediciones son susceptibles a los cambios de las condiciones analíticas, éstas deben ser controladas adecuadamente o debe incluirse en el método una nota de precaución al respecto; por lo que es conveniente establecer una serie de pruebas de la verificación del sistema, que aseguren un correcto funcionamiento del método, durante su uso rutinario.

Las pruebas de verificación del sistema se basan en el concepto de que: el equipo o instrumentos de medición, las operaciones analíticas y las muestras que van a ser analizadas constituyen un sistema integral, que puede ser evaluado como tal. Las características que se establecen como representativas de la verificación, dependen del método a ser evaluado. Éstas son importantes especialmente en el caso de métodos cromatográficos. [9]

Precisión del sistema

El sistema, analista, equipo e instrumentos de medición, soluciones de referencia, etc. originan una variabilidad inherente asociada a la respuesta analítica (absorbancia, transmitancia, mililitros consumidos, área del pico, altura del pico, área relativa, peso, entre otros), que en general es aditiva a la del método, por lo que, es importante verificar, que su valor no sea una fuente importante de variabilidad. [9]

Linealidad del sistema

Cuando la relación entre la concentración y la respuesta del analito (o sus transformaciones matemáticas) no es lineal dentro del intervalo de trabajo, dará lugar a la inexactitud del método analítico, por lo que, es conveniente verificarlo bajo las condiciones del laboratorio. [9]

Especificidad/selectividad del método.

Permite investigar la influencia de la muestra en las determinaciones cuantitativas o cualitativas de un método analítico. En la mayoría de los casos, los métodos cuantitativos que son específicos/selectivos, son exactos. [9]

Exactitud del método.

La exactitud del método debe ser determinada a todos los métodos de carácter cuantitativo, a la exactitud también se le relaciona con el concepto de sesgo de la medición. [9]

Linealidad e intervalo del método.

Todo método analítico no debe presentar sesgo (error sistemático) dentro del intervalo de cuantificación, por lo que es necesario seleccionar al menos tres niveles de concentración (intervalo), que permitan demostrar exactitud y linealidad. Es necesario que el intervalo incluya los límites de especificación de la aplicación del método. [9]

Precisión del método.

Cuando un método analítico es exacto y lineal, la variabilidad de un resultado analítico se debe a factores aleatorios, como la incertidumbre de las mediciones debidas a: la balanza analítica, material graduado, material volumétrico, instrumento de medición de la respuesta analítica, corridas analíticas, analistas, laboratorios, lotes de reactivos, etc. Estos factores se pueden clasificar en factores aleatorios intramétodo, intralaboratorio e interlaboratorio. La precisión intramétodo se mide en términos de repetibilidad (bajo las mismas condiciones analíticas), la reproducibilidad intralaboratorio se mide en términos de la precisión intermedia (bajo diferentes condiciones analíticas), la reproducibilidad interlaboratorios se mide en términos de estudios colaborativos. ^[9]

Límite de detección del método.

El límite de detección es una característica de desempeño analítico que debe determinarse cuando un método analítico se aplica como prueba límite. ^[9]

Límite de cuantificación del método.

El límite de cuantificación es una característica de desempeño analítico, que determina la capacidad cuantitativa del método a concentraciones bajas del analito en la muestra y se debe determinar en los métodos cuantitativos categoría II. ^[9]

Tolerancia del método.

Los resultados de los métodos analíticos pueden variar por una serie de factores relacionados con diferentes condiciones externas o no inherentes al método (por ejemplo, instrumentos, marcas de reactivos, proveedores de columnas, corridas analíticas, laboratorios, analistas, lotes de reactivos, etc.), por lo que es necesario investigar su reproducibilidad. ^[9]

Robustez del método.

Los resultados de los métodos analíticos pueden ser afectados por una serie de factores relacionados con las condiciones instrumentales o inherentes a éste, que puede afectar la exactitud del método, (por ejemplo, temperatura de la columna, presión de la columna, velocidad de flujo, pH de fases, volúmenes de solventes orgánicos para una extracción, etc.), los cuales se presentan normalmente durante una corrida analítica, por lo que es necesario investigar su efecto bajo pequeños cambios deliberados, fijados por el analista para asegurar la confiabilidad de resultados.

La robustez y la tolerancia son conceptos diferentes, ya que el primero se refiere a la influencia de factores internos del método que pudiesen afectar la exactitud del método, mientras que la tolerancia, se refiere a factores externos al método que pueden impactar en la reproducibilidad de los resultados.

Para su investigación se pueden establecer los siguientes casos:

- *Investigación de tres factores como máximo.* En este caso se establecen un nivel inferior y uno superior respecto al nivel de operación. Esto debe ser realizado para cada uno de los factores a investigar.
- *Investigación de cuatro a siete factores (Diseño de Placket Burman para estudios de robustez).* En este texto únicamente se explican los pasos del procedimiento del diseño experimental Placket Burman para 8 corridas analíticas, el cual permite investigar la robustez del método desde 3 a 7 factores (para fines prácticos de 3 a 5). Para un mayor número de factores se sugiere consultar cualquier libro de diseño de experimentos que incluya este tema. El procedimiento consiste en los siguientes pasos:
 - a) Selección de los factores a estudiar.
 - b) Elección de los niveles de cada factor.
 - c) Determinación de las corridas analíticas.
 - d) Ejecución de las corridas analíticas para generar los resultados.
 - e) Análisis de los resultados.
 - f) Conclusión respecto de la robustez del método analítico. ^[9]

Revalidación

Cuando se hacen cambios a un método validado, se debe determinar, la influencia de estos cambios, y cuando se encuentre que estos afectan la validación inicial, se debe realizar una nueva validación del método. ^[13]

Un cambio importante el procedimiento analítico, en la composición del producto analizado, o en la síntesis del ingrediente farmacéutico activo, requerirá revalidación del procedimiento analítico. ^[9, 15, 16]

*Capítulo 2. Protocolo de validación de métodos
analíticos*

Descripción de un protocolo de validación

Se debe elaborar el método analítico previo a la realización del protocolo de validación del método analítico. Se recomienda que el método analítico elaborado, sea revisado en caso de que requiera correcciones, éstas se deben de indicar de forma clara y concisa.

De acuerdo con el apéndice V. Principios generales de buenas prácticas de laboratorio de la FEUM 13va edición, indica que la validación debe llevarse a cabo de conformidad con un protocolo que detalle las características de desempeño que deben poseer los procedimientos analíticos. En el mismo protocolo se declara el alcance de la validación, de tal forma que se justifique la idoneidad del método para sus necesidades particulares. [9]

Elaborar un protocolo que incluya lo siguiente:

PROTOCOLO DE VALIDACIÓN [5]

Título:	Protocolo de validación. Señalar asimismo el nombre y clave del método que se pretende validar.
Objetivo:	Considerar los parámetros de desempeño a evaluar y el analito a determinar.
Campo de aplicación:	Indicar el tipo de producto (s) para el (os) cual (es) aplica la validación.
Método de ensayo:	Elaborar un diagrama de flujo simplificado, que señale la metodología empleada para cuantificar el analito (método interno).
Equipos y/o instrumentos:	Descripción general del equipo a utilizar en la validación.
Materiales:	Indicar los materiales a utilizar separando como material de uso general y material volumétrico
Reactivos:	Indicar el nombre de los reactivos a utilizar y su grado. Señalar los patrones a utilizar con su grado de pureza o concentración. Detallar la preparación de las soluciones de trabajo (soluciones que no requieren de un valor de título exacto). Detallar la preparación de las soluciones de referencia (soluciones que requieren de un título exacto, soluciones stock, curva de calibración, etc.).

PROTOCOLO DE VALIDACIÓN ^[5]

Muestras:	Indicar las características, forma de almacenamiento y cantidades de muestra estimadas para llevar a cabo la validación. Detallar la preparación de los blancos de muestra o muestras adicionadas.
Desarrollo experimental:	Detallar las instrucciones para cada uno de los parámetros de desempeño a ensayar.
Resultados:	Propuesta de formato de registro.
Criterios de aceptación:	Establecer los criterios de aceptación que deben cumplirse con su respectiva referencia bibliográfica.

Debe incluir las características de desempeño mencionadas en el *Capítulo 3 Evaluación de las características de desempeño analítico* de acuerdo con el tipo de prueba para los diferentes tipos de procedimientos analíticos y los criterios de aceptación predeterminados.

Debe ser aprobado previo a su uso y en su caso los cambios efectuados antes de su implementación. Incluir firmas de quien elaboró, revisó y aprobó. ^[5]

*Capítulo 3. Evaluación de las características de
desempeño analítico*

Preparación de muestras

Previo a la evaluación de las características de desempeño analítico, se recomienda tener presentes las siguientes consideraciones en la preparación de muestras por analizar:

1. Utilizar placebos o producto farmacéutico en una cantidad equivalente a la indicada por la monografía del producto.
2. Cuando no se dispone de un placebo, determinar el contenido del analito en un producto farmacéutico. Preparar estas muestras utilizando una cantidad equivalente a la mitad de la muestra original establecida por el método y adicionar diferentes niveles de concentración de estándar hasta alcanzar los niveles de concentración establecidos conforme al protocolo.
3. Cuando no sea posible adicionar de manera directa el analito al producto farmacéutico o placebo, la adición puede ser llevada a cabo en alguna etapa del método, de preferencia en las primeras etapas.
4. Los placebos o productos farmacéuticos deben ser preparados por un mismo analista (según aplique a la característica de desempeño analítico a evaluar).^[5]

Cálculo del porcentaje de recobro

El porcentaje de recobro (% R) consiste en el cociente porcentual de la concentración recuperada entre la concentración adicionada^[9], aplicando la siguiente fórmula:

$$\% R = \frac{[C_{RE}]}{[C_{AD}]} \times 100 \%$$

Donde:

[CAD] = Concentración adicionada.

[CRE] = Concentración recuperada.^[5]

Se considera que la concentración adicionada [CAD] es aquella en donde el procesamiento final (pesado, diluciones u alícuotas) de la sustancia de referencia y la muestra corresponden al 100% del cálculo teórico de la concentración del analito a evaluar o la que sea requerida para cada característica de desempeño a evaluar. Mientras que la concentración recuperada [CRE] se obtiene a partir del promedio aritmético los datos experimentales de la respuesta analítica de una serie de inyecciones de la solución de referencia correspondiente al 100 % de la concentración a evaluar con respecto a los resultados de las muestras independientemente de la concentración evaluada, la [CRE] se calcula aplicando la siguiente formula:

$$[C_{RE}] = \frac{\text{Área mta} \times [STD]}{\text{Área } \bar{x} \text{ STD}}$$

Donde:

[CRE] = Concentración recuperada.

Área mta = Área de la solución muestra

[STD] = Concentración de la solución de referencia.

Área \bar{x} STD = Área promedio de la solución de referencia.

Descripción de una validación de cuantificación por CLAR

Se describe la interpretación de resultados simulados de para cada una de las características de desempeño analítico descritas en el *Capítulo 3. Evaluación de las características de desempeño analítico*, con el objetivo de llevar a cabo una validación del método analítico para la cuantificación de un analito A presente en un medicamento, consta de las siguientes características:

- Se maneja un estándar de referencia primario del analito A con una pureza base húmeda de 100.0%, el cual no requiere ningún tratamiento previo a su uso.
- Se emplean disoluciones de estándar de referencia y muestra (placebo analítico, placebo o muestras adicionados de analito) a una concentración de 1.0 mg/mL correspondiente al 100 % de la concentración del analito a evaluar, así como soluciones de referencia de 2.0 mg/mL que por medio de alícuotas son empleadas para realizar las curvas de calibración de ciertas características de desempeño evaluadas.
- La validación es llevada a cabo en dos días diferentes por dos analistas (ver “Tabla 3”), se realiza el cálculo del porcentaje de recobro ($\% R$) considerando el área promedio y concentración de la solución de referencia de la Verificación del sistema (Aptitud del sistema) realizada por cada analista en su correspondiente día de validación para el cálculo de la concentración recuperada $[C_{RE}]$.

Tabla 3. Distribución de las actividades de validación de cuantificación por CLAR

Característica de desempeño analítico	Día de validación		Analista	
	1	2	1	2
Verificación del sistema	✓	✓	✓	✓
Precisión del sistema	✓		✓	
Linealidad del sistema	✓		✓	
Especificidad/Selectividad	✓		✓	
Estabilidad analítica	✓	✓	✓	
Exactitud del método	✓		✓	
Linealidad e intervalo del método	✓		✓	
Precisión del método	✓	✓	✓	✓
Tolerancia del método		✓	✓	
Robustez del método		✓	✓	
Límite de detección del método		✓	✓	
Límite de cuantificación del método		✓	✓	

Verificación del sistema para métodos cromatográficos (Aptitud del sistema)

Determinación de verificación del sistema

- I. Preparar de forma individual para cada día de validación y analista la solución de sustancia de referencia que represente el 100% de la cantidad o concentración del analito de la muestra para métodos de categoría I.
- II. Inyectar por sextuplicado, analizar de manera individual cada solución preparada bajo las condiciones de medición establecidas en el método analítico. ^[9]

Análisis de datos de verificación del sistema

- I. Reportar la respuesta del analito, conforme a la evidencia analítica calcular el promedio aritmético (\bar{x}), la desviación estándar (s) y el coeficiente de variación (CV). ^[1, 3]
- II. Definir el valor de aceptación de otros datos de buenas prácticas cromatográficas: factor de capacidad cromatográfico (k'), factor de coleo (T), platos teóricos (N) y resolución cromatográfica (R), según aplique para cada inyección de acuerdo con el método analítico a validar. ^[1, 9]

Criterios de aceptación de verificación del sistema

- $CV \leq 2.0 \%$ para métodos cromatográficos. ^[1, 3]

Se recomiendan los siguientes valores por buenas prácticas cromatográficas, a menos que se especifique un valor diferente en la monografía individual.

- $k' > 1.5$.
- $T < 2.0$.
- N , determinar desde el inicio del análisis y monitorear su valor hasta un mínimo permitido previamente.
- $R > 2.0$. ^[1, 9]

Ejemplo práctico de verificación del sistema (Aptitud del sistema)

Se prepara una solución estándar por analista y día de validación a una concentración de 1.0 mg/mL correspondiente al 100 % de la concentración del analito a evaluar. Se obtienen los resultados:

APTITUD DEL SISTEMA ANALISTA 1 — DÍA 1

Inyección	Nombre de la muestra	Área (AU)	Coleo USP	Platos teóricos USP	K Prime
1	Solución referencia A1-D1	345948	1.1	6895	1.8
2	Solución referencia A1-D1	346240	1.1	6892	1.8
3	Solución referencia A1-D1	344597	1.1	6859	1.8
4	Solución referencia A1-D1	346444	1.2	6900	1.8
5	Solución referencia A1-D1	346367	1.1	6886	1.8
6	Solución referencia A1-D1	344884	1.1	6868	1.8

APTITUD DEL SISTEMA ANALISTA 2 — DÍA 1

Inyección	Nombre de la muestra	Área (AU)	Coleo USP	Platos teóricos USP	K Prime
1	Solución referencia A2-D1	345236	1.1	6896	1.8
2	Solución referencia A2-D1	344652	1.1	6863	1.8
3	Solución referencia A2-D1	344508	1.2	6847	1.8
4	Solución referencia A2-D1	344800	1.1	6870	1.8
5	Solución referencia A2-D1	345050	1.1	6833	1.8
6	Solución referencia A2-D1	345217	1.2	6803	1.8

APTITUD DEL SISTEMA ANALISTA 1 — DÍA 2

Inyección	Nombre de la muestra	Área (AU)	Coleo USP	Platos teóricos USP	K Prime
1	Solución referencia A1-D2	346334	1.2	6786.0	1.8
2	Solución referencia A1-D2	344340	1.2	6722.0	1.8
3	Solución referencia A1-D2	346960	1.1	6764.0	1.7
4	Solución referencia A1-D2	345683	1.1	6742.0	1.8
5	Solución referencia A1-D2	346215	1.1	6772.0	1.8
6	Solución referencia A1-D2	344112	1.1	6716.0	1.8

APTITUD DEL SISTEMA ANALISTA 2 — DÍA 2

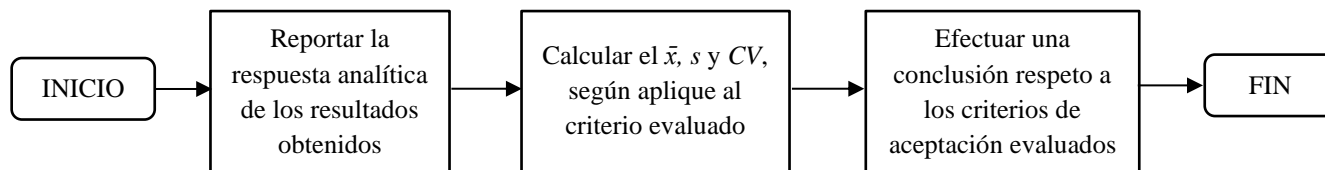
Inyección	Nombre de la muestra	Área (AU)	Coleo USP	Platos teóricos USP	K Prime
1	Solución referencia A2-D2	345145	1.1	6701.0	1.8
2	Solución referencia A2-D2	345537	1.2	6744.0	1.8
3	Solución referencia A2-D2	346964	1.1	6792.0	1.8
4	Solución referencia A2-D2	346199	1.2	6703.0	1.8
5	Solución referencia A2-D2	345604	1.2	6764.0	1.8
6	Solución referencia A2-D2	345897	1.1	6713.0	1.8

Cálculos

Fórmulas empleadas

- Promedio aritmético (\bar{x}), desviación estándar (s) y coeficiente de variación (CV).

Diagrama de procesamiento de datos



Desarrollo de cálculos

Aptitud del sistema analista 1 — día 1

1. Cálculo de Σx de área, coleo USP, platos teóricos USP y K Prime:

$$\Sigma \bar{x} \text{ del área} = 345948 + 346240 + 344597 + 346444 + 346367 + 344884 = 2074480$$

$$\Sigma \bar{x} \text{ del coleo USP} = 1.1 + 1.1 + 1.1 + 1.2 + 1.1 + 1.1 = 6.7$$

$$\Sigma \bar{x} \text{ de los platos teóricos USP} = 6895 + 6892 + 6859 + 6900 + 6886 + 6868 = 41300$$

$$\Sigma \bar{x} \text{ de K Prime} = 1.8 + 1.8 + 1.8 + 1.8 + 1.8 + 1.8 = 10.8$$

2. Cálculo del promedio aritmético (\bar{x}) del área, coleo USP, platos teóricos USP y K Prime:

$$n = 6$$

$$\bar{x} \text{ del área} = 2074480/6 = 345746.7 \approx 345747$$

$$\bar{x} \text{ del coleo USP} = 6.7/6 = 1.12 \approx 1.1$$

$$\bar{x} \text{ de los platos teóricos USP} = 41300/6 = 6883.33 \approx 6883$$

$$\bar{x} \text{ de K Prime} = 10.8/6 = 1.8$$

3. Cálculo de la desviación estándar (s) y coeficiente de variación (CV) del área:

$$\Sigma(x - \bar{x})^2 = (345948 - 345747)^2 + (346240 - 345747)^2 + (344597 - 345747)^2 + (346444 - 345747)^2 + (346367 - 345747)^2 + (344884 - 345747)^2 = 3220928$$

$$s = \sqrt{\frac{3220928}{6 - 1}} = 802.61$$

$$CV = \frac{802.61}{345747} \times 100 = 0.23 \approx 0.2$$

Aptitud del sistema analista 2 — día 1

1. Cálculo de Σx de área, coleo USP, platos teóricos USP y K Prime:

$$\Sigma \bar{x} \text{ del área} = 345236 + 344652 + 344508 + 344800 + 345050 + 345217 = 2069463$$

$$\Sigma \bar{x} \text{ del coleo USP} = 1.1 + 1.1 + 1.2 + 1.1 + 1.1 + 1.2 = 6.8$$

$$\Sigma \bar{x} \text{ de los platos teóricos USP} = 6896 + 6863 + 6847 + 6870 + 6833 + 6803 = 41112$$

$$\Sigma \bar{x} \text{ de K Prime} = 1.8 + 1.8 + 1.8 + 1.8 + 1.8 + 1.8 = 10.8$$

2. Cálculo del promedio aritmético (\bar{x}) del área, coleo USP, platos teóricos USP y K Prime:

$$n = 6$$

$$\bar{x} \text{ del área} = 2069463/6 = 344910.5 \approx 344911$$

$$\bar{x} \text{ del coleo USP} = 6.8/6 = 1.13 \approx 1.1$$

$$\bar{x} \text{ de los platos teóricos USP} = 41112/6 = 6852$$

$$\bar{x} \text{ de K Prime} = 10.8/6 = 1.8$$

3. Cálculo de la desviación estándar (s) y coeficiente de variación (CV) del área:

$$\Sigma(x - \bar{x})^2 = (345236 - 344911)^2 + (344652 - 344911)^2 + (344508 - 344911)^2 + (344800 - 344911)^2 + (345050 - 344911)^2 + (345217 - 344911)^2 = 460393$$

$$s = \sqrt{\frac{460393}{6 - 1}} = 303.44$$

$$CV = \frac{303.44}{344911} \times 100 = 0.09 \approx 0.1$$

Aptitud del sistema analista 1 — día 2

1. Cálculo de Σx de área, coleo USP, platos teóricos USP y K Prime:

$$\Sigma \bar{x} \text{ del área} = 346334 + 344340 + 346960 + 345683 + 346215 + 344112 = 2073644$$

$$\Sigma \bar{x} \text{ del coleo USP} = 1.2 + 1.2 + 1.1 + 1.1 + 1.1 + 1.1 = 6.8$$

$$\Sigma \bar{x} \text{ de los platos teóricos USP} = 6786 + 6722 + 6764 + 6742 + 6772 + 6716 = 40502$$

$$\Sigma \bar{x} \text{ de K Prime} = 1.8 + 1.8 + 1.7 + 1.8 + 1.8 + 1.8 = 10.7$$

2. Cálculo del promedio aritmético (\bar{x}) del área, coleo USP, platos teóricos USP y K Prime:

$$n = 6$$

$$\bar{x} \text{ del área} = 2073644/6 = 345607.33 \approx 345607$$

$$\bar{x} \text{ del coleo USP} = 6.8/6 = 1.13 \approx 1.1$$

$$\bar{x} \text{ de los platos teóricos USP} = 40502/6 = 6750$$

$$\bar{x} \text{ de K Prime} = 10.7/6 = 1.78 \approx 1.8$$

3. Cálculo de la desviación estándar (s) y coeficiente de variación (CV) del área:

$$\Sigma(x - \bar{x})^2 = (346334 - 345607)^2 + (344340 - 345607)^2 + (346960 - 345607)^2 + (345683 - 345607)^2 + (346215 - 345607)^2 + (344112 - 345607)^2 = 6574892$$

$$s = \sqrt{\frac{6574892}{6 - 1}} = 1146.73$$

$$CV = \frac{1146.73}{345607} \times 100 = 0.33 \approx 0.3$$

Aptitud del sistema analista 2 — día 2

1. Cálculo de Σx de área, coleo USP, platos teóricos USP y K Prime:

$$\Sigma \bar{x} \text{ del área} = 345145 + 345537 + 346964 + 346199 + 345604 + 345897 = 2075346$$

$$\Sigma \bar{x} \text{ del coleo USP} = 1.1 + 1.2 + 1.1 + 1.2 + 1.2 + 1.1 = 6.9$$

$$\Sigma \bar{x} \text{ de los platos teóricos USP} = 6701 + 6744 + 6792 + 6703 + 6764 + 6713 = 40417$$

$$\Sigma \bar{x} \text{ de K Prime} = 1.8 + 1.8 + 1.8 + 1.8 + 1.8 + 1.8 = 10.8$$

2. Cálculo del promedio aritmético (\bar{x}) del área, coleo USP, platos teóricos USP y K Prime:

$$n = 6$$

$$\bar{x} \text{ del área} = 2075346/6 = 345891$$

$$\bar{x} \text{ del coleo USP} = 6.9/6 = 1.15 \approx 1.2$$

$$\bar{x} \text{ de los platos teóricos USP} = 40417/6 = 6736$$

$$\bar{x} \text{ de K Prime} = 10.8/6 = 1.8$$

3. Cálculo de la desviación estándar (s) y coeficiente de variación (CV) del área:

$$\Sigma(x - \bar{x})^2 = (345145 - 345891)^2 + (345537 - 345891)^2 + (346964 - 345891)^2 + (346199 - 345891)^2 + (345604 - 345891)^2 + (345897 - 345891)^2 = 2010430$$

$$s = \sqrt{\frac{2010430}{6 - 1}} = 634.10$$

$$CV = \frac{634.10}{345891} \times 100 = 0.18 \approx 0.2$$

Criterio de aceptación

Criterio de aceptación	Resultados día 1		Conclusión
	Analista 1	Analista 2	
$CV \leq 2.0 \%$	$CV = 0.2 \%$	$CV = 0.1 \%$	Cumple
Factor de capacidad (k') > 1.5.	$k'=1.8$	$k'=1.8$	Cumple
Factor de coleo (T) < 2.0.	$T = 1.1$	$T = 1.1$	Cumple
Platos teóricos (N) ≥ 2000	$N= 6883$	$N= 6852$	Cumple

Criterio de aceptación	Resultados día 2		Conclusión
	Analista 1	Analista 2	
$CV \leq 2.0 \%$	$CV = 0.3 \%$	$CV = 0.2$	Cumple
Factor de capacidad (k') > 1.5.	$k'=1.8$	$k'=1.8$	Cumple
Factor de coleo (T) < 2.0.	$T = 1.1$	$T = 1.2$	Cumple
Platos teóricos (N) ≥ 2000	$N= 6750$	$N= 6736$	Cumple

Precisión del sistema

Determinación de precisión del sistema

- I. Preparar por lo menos un sextuplicado, ya sea por dilución (a partir de una solución concentrada) o por pesadas independientes, soluciones de referencia que representen al 100% de la cantidad o concentración del analito de la muestra.
- II. Analizar de manera individual cada solución preparada bajo las condiciones de medición establecidas en el método analítico. ^[9]

Análisis de datos de precisión del sistema

- I. Reportar la respuesta del analito, conforme a la evidencia analítica calcular el promedio aritmético (\bar{x}), la desviación estándar (s) y el coeficiente de variación (CV). ^[9]

Criterio de aceptación de precisión del sistema

- $CV \leq 1.5\%$ para métodos fisicoquímicos. ^[3]

Ejemplo práctico de precisión del sistema

Se prepara por sextuplicado una solución de referencia de concentración de 1.0 mg/mL correspondiente al 100 % de la concentración del analito a evaluar a partir de pesadas independientes

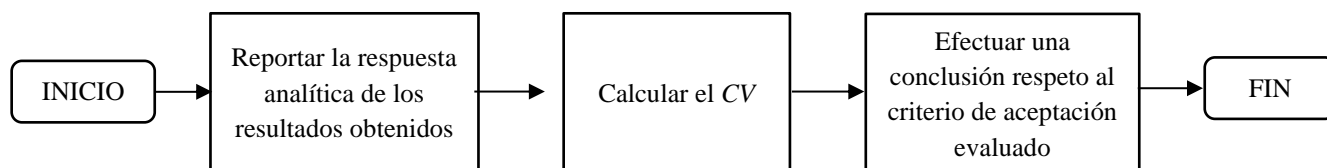
PRECISIÓN DEL SISTEMA		
Inyección	Nombre de la muestra	Área (AU)
1	Solución referencia 1	346568
2	Solución referencia 2	344135
3	Solución referencia 3	346816
4	Solución referencia 4	346684
5	Solución referencia 5	346473
6	Solución referencia 6	345009

Cálculos

Fórmulas empleadas

- Promedio aritmético (\bar{x}), desviación estándar (s) y coeficiente de variación (CV).

Diagrama de procesamiento de datos



Desarrollo de cálculos

1. Cálculo de Σx , promedio aritmético (\bar{x}), desviación estándar (s) y coeficiente de variación (CV) del área.

$$\Sigma \bar{x} \text{ del área} = 346568 + 344135 + 346816 + 346684 + 346473 + 345009 = 2075685$$

$$n = 6$$

$$\bar{x} \text{ del área} = 2075685/6 = 345947.5 \approx 345948$$

$$\Sigma(x - \bar{x})^2 = (346568 - 345948)^2 + (344135 - 345948)^2 + (346816 - 345948)^2 + (346684 - 345948)^2 + (346473 - 345948)^2 + (345009 - 345948)^2 = 6123835$$

$$s = \sqrt{\frac{6123835}{6 - 1}} = 1106.69$$

$$CV = \frac{1106.69}{345948} \times 100 = 0.32 \approx 0.3$$

Criterio de aceptación

Criterio de aceptación	Resultado	Conclusión
$CV \leq 1.5 \%$	$CV = 0.3 \%$	Cumple

Linealidad del sistema

Determinación de linealidad del sistema

- I. Preparar por triplicado al menos 5 niveles de concentración (intervalo) de una solución de referencia, ya sea por dilución (a partir de una solución concentrada) o por pesadas independientes. El intervalo debe incluir las concentraciones esperadas del analito o su especificación, según la aplicación analítica del método.
- II. Analizar las muestras preparadas bajo las condiciones de medición establecidas en el método analítico. ^[9]

Análisis de datos de linealidad del sistema

- I. Reportar la respuesta analítica para cada nivel de concentración adicionado.
- II. Graficar los valores de respuesta analítica (y) obtenidos en función de cada uno de los valores de concentración adicionada (x), verificar de manera visual la existencia de linealidad de los datos.
- III. Calcular el valor de la pendiente (b), la ordenada al origen (a), coeficiente de determinación (r^2) y el intervalo de confianza para la pendiente $IC(\beta_1)$. ^[1, 3, 9]

Criterios de aceptación de linealidad del sistema

- $r^2 \geq 0.98$.
- $IC(\beta_1)$ no debe incluir el cero. ^[3]

Ejemplo práctico de linealidad del sistema

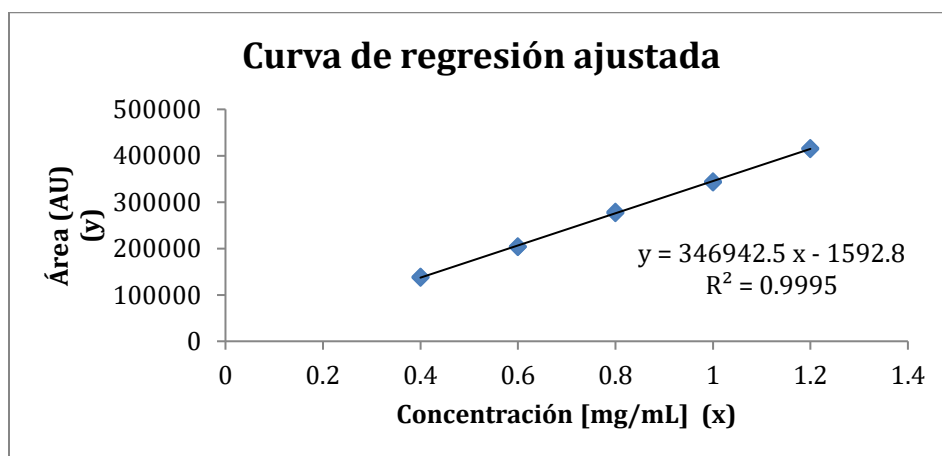
Se prepara por triplicado una solución de referencia a una concentración de 2.0 mg/mL a partir de pesadas independientes. De cada solución de referencia preparada se toma una serie alícuotas para preparar una curva de calibración (CC) con soluciones al 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 y 1.2 mg/mL correspondientes al 40, 60, 80, 100 y 120% respectivamente a la concentración del analito a evaluar.

LINEALIDAD DEL SISTEMA

Inyección	Nombre de la muestra	Concentración [mg/mL] (x)	Área (AU) (y)
1	Solución referencia 40% - CC 1	0.4	136595
2	Solución referencia 40% - CC 2	0.4	140029
3	Solución referencia 40% - CC 3	0.4	138638
4	Solución referencia 60% - CC 1	0.6	203322
5	Solución referencia 60% - CC 2	0.6	205261
6	Solución referencia 60% - CC 3	0.6	203724

LINEALIDAD DEL SISTEMA

Inyección	Nombre de la muestra	Concentración [mg/mL] (x)	Área (AU) (y)
7	Solución referencia 80% - CC 1	0.8	279855
8	Solución referencia 80% - CC 2	0.8	276552
9	Solución referencia 80% - CC 3	0.8	277745
10	Solución referencia 100% - CC 1	1.00	343418
11	Solución referencia 100% - CC 2	1.00	345181
12	Solución referencia 100% - CC 3	1.00	342309
13	Solución referencia 120% - CC 1	1.20	414140
14	Solución referencia 120% - CC 2	1.20	417037
15	Solución referencia 120% - CC 3	1.20	415612

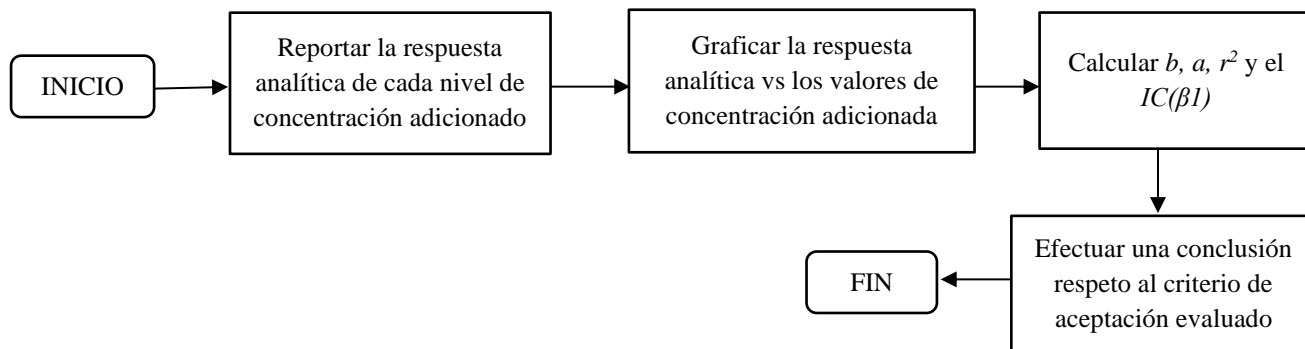


Cálculos

Fórmulas empleadas

- Pendiente (b), ordenada al origen (a) y coeficiente de determinación (r^2).
- Intervalo de confianza para la pendiente $IC(\beta_1)$, desviación estándar de la regresión ($s_{y/x}$) y desviación estándar de la pendiente (sb_1).

Diagrama de procesamiento de datos



Desarrollo de cálculos

1. Cálculo de Σx , Σy , Σxy , Σx^2 , Σy^2

$$\begin{aligned} \Sigma x \text{ del área} &= 0.4 + 0.4 + 0.4 + 0.6 + 0.6 + 0.6 + 0.8 + 0.8 + 0.8 + 1.0 + 1.0 + 1.0 + 1.2 + 1.2 + 1.2 = 12 \\ \Sigma y \text{ del área} &= 136595 + 140029 + 138638 + 203322 + 205261 + 203724 + 279855 + 276552 + 277745 \\ &\quad + 343418 + 345181 + 342309 + 414140 + 417037 + 415612 = 4139418 \\ \Sigma xy \text{ del área} &= (0.4 \times 136595) + (0.4 \times 140029) + (0.4 \times 138638) + (0.6 \times 203322) + (0.6 \times 205261) \\ &\quad + (0.6 \times 203724) + (0.8 \times 279855) + (0.8 \times 276552) + (0.8 \times 277745) + (1.0 \times 343418) \\ &\quad + (1.0 \times 345181) + (1.0 \times 342309) + (1.2 \times 414140) + (1.2 \times 417037) + (1.2 \times 415612) \\ &= 3727865.4 \\ \Sigma x^2 \text{ del área} &= 0.4^2 + 0.4^2 + 0.4^2 + 0.6^2 + 0.6^2 + 0.6^2 + 0.8^2 + 0.8^2 + 0.8^2 + 1.0^2 + 1.0^2 + 1.0^2 + 1.2^2 \\ &\quad + 1.2^2 + 1.2^2 = 10.8 \\ \Sigma y^2 \text{ del área} &= 136595^2 + 140029^2 + 138638^2 + 203322^2 + 205261^2 + 203724^2 + 279855^2 + 276552^2 \\ &\quad + 277745^2 + 343418^2 + 345181^2 + 342309^2 + 414140^2 + 417037^2 + 415612^2 \\ &= 1.286830737 \times 10^{12} \end{aligned}$$

$$n = 15$$

2. Cálculo de la pendiente (b), ordenada al origen (a) y coeficiente de determinación (r^2).

$$\begin{aligned} b &= \frac{(15 \times 3727865.4) - (12 \times 4139418)}{(15 \times 10.8) - (12)^2} = 346942.5 \\ a &= \frac{4339418 - (346942.5 \times 12)}{15} = -1592.8 \\ r^2 &= \frac{[(15 \times 3727865.4) - (12 \times 4139418)]^2}{[(15 \times 10.8) - (12)^2] \times [(15 \times 1.286830737 \times 10^{12}) - (12)^2]} = 0.9995 \end{aligned}$$

3. Cálculo de la desviación estándar de la regresión ($S_{y/x}$), desviación estándar de la pendiente (sb_1) para el intervalo de confianza para la pendiente $IC(\beta_1)$.

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{1.286830737 \times 10^{12} - (346942.5 \times 3727865.4) - (-1592.8 \times 4139418)}{15 - 2}}$$

$$S_{y/x} = 2304.85$$

$$sb_1 = 2304.85 \sqrt{\frac{1}{10.8 - \frac{(12)^2}{15}}} = 2104.03$$

$$IC(\beta_1) = 346942.5 - 2.160 \times 2104.03 = 342397.8$$

$$IC(\beta_1) = 346942.5 + 2.160 \times 2104.03 = 351487.2$$

INTERVALO DE CONFIANZA PARA LA PENDIENTE		
$IC(\beta_1)$	342397.8	351487.2

Criterio de aceptación

Criterio de aceptación	Resultado	Conclusión
$r^2 \geq 0.98$	$r^2 = 0.9995$	Cumple
$IC(\beta_1)$ no debe incluir el cero	$IC(\beta_1) = 342397.8 - 351487.2$, no incluye el cero	Cumple

Especificidad/Selectividad

Determinación de especificidad

Se debe determinar que la respuesta analítica se debe únicamente al analito. ^[9]

- I. Preparar por lo menos tres muestras adicionadas y placebos analíticos a un nivel de concentración del 100% del analito a evaluar.
- II. Analizar por triplicado blancos de reactivos conforme a lo establecido en la monografía del ingrediente farmacéutico activo o producto farmacéutico, la solución de referencia (preparada en el correspondiente día de validación que haya sido evaluado la característica de desempeño) y de forma individual las muestras preparadas previamente bajo las condiciones de medición establecidas en el método analítico. ^[5]
- III. Analizar de manera individual cada solución preparada bajo las condiciones de medición establecidas en el método analítico.

Determinación de selectividad

Para el caso de métodos analíticos que van a ser utilizados en estudios de estabilidad, la evaluación de la selectividad es obligatoria. Se debe determinar la respuesta a componentes como; sustancias de degradación del fármaco originadas por la influencia de condiciones de almacenamiento (temperatura, humedad, luz, etc.) o en condiciones extremas (hidrólisis, oxidación, etc.).

- I. Realizar el análisis a blancos de reactivos (a), sustancias de referencia (b), muestras adicionadas de analito (c) y placebos analíticos (d) que hayan permanecido en condiciones de almacenamiento (temperatura, humedad, luz, etc.) o en condiciones extremas (hidrólisis, oxidación, etc.) con la finalidad de favorecer la inestabilidad del analito en la muestra. ^[9]
 - i. Las condiciones de estrés para lograr la degradación del orden del 10-20% en la mayoría de los principios activos son:

CONDICIONES DE ESTRÉS ^[1]

Condiciones para la forma farmacéutica	Condiciones para la materia prima
Calor (40-70 ° C)	Calor (40 — 100 ° C)
Luz	Luz
Humedad relativa (85 %)	Ácido (HCl 0.1 N)
	Base (NaOH 0.1 N)
	Oxidante (H ₂ O ₂ 3 %)

- ii. Agregar a un matraz volumétrico la cantidad de volumen de la muestra a emplear (a, b, c, d) de acuerdo al punto I.
- iii. Realizar el tratamiento de la muestra adicionando el volumen del agente degradante (cuando aplique), mezclar y dejar el tiempo de exposición y temperatura que corresponda, agregar el volumen del agente neutralizante (cuando aplique) y llevar a volumen de aforo, una vez transcurrido el tiempo de exposición (las soluciones b, c y d, deben llegar a un nivel de concentración del 100% indicado en el método).
- iv. Inyectar al menos por triplicado las muestras llevadas a condiciones de estrés, así como a un grupo control de muestras (a, b, c y d) sin degradar.

Análisis de datos de especificidad/selectividad

- a. Demostrar evidencia de que la respuesta analítica del método sea debida únicamente al analito. ^[9]

Criterios de aceptación especificidad/selectividad

En CLAR el pico de interés (analito):

- *Debe eluir al mismo tiempo de retención en la muestra de prueba y sustancia de referencia.*
- *No debe aparecer en el cromatograma del blanco de reactivos.*
- *Debe cumplir con los criterios establecidos para la aptitud del sistema.*
- *En CLAR se puede evaluar la pureza del pico utilizando un detector de arreglo de diodos. ^[5]*

Además, en el caso de selectividad:

- *El método debe permitir distinguir entre todas las posibles especies químicas que puedan generarse, la resolución (R) cromatográfica entre picos ≥ 1.5 (los picos están resueltos hasta la línea de base) o conforme a lo establecido en la monografía del ingrediente farmacéutico activo o producto farmacéutico. ^[1]*

Ejemplo descriptivo de especificidad/selectividad

La información empleada para describir el apartado de *Ejemplo descriptivo de especificidad/selectividad* corresponde a la publicación de Kowalska et al (2022) en donde el enfoque:

Se centró principalmente en la validación del método para determinar el contenido de ácido salicílico e impurezas desconocidas individuales en nuevos productos farmacéuticos: tabletas que contienen: 75, 100 o 150 mg de ácido acetilsalicílico y glicina en la cantidad de 40 mg para cada dosificación.

La separación de los componentes se realizó mediante HPLC, utilizando como fase estacionaria una columna Waters Symmetry C18 (4,6 × 250 mm, 5 µm). La fase móvil consistió en una mezcla de ácido ortofosfórico al 85%, acetonitrilo y agua purificada (2:400:600V/V/V). La detección se llevó a cabo a una longitud de onda de 237 nm, con un caudal constante de 1.0 ml/min (p. 1)

El interés en Kowalska et al (2022) consiste en que aborda la descripción de la preparación de las soluciones de empleadas, así como los métodos para determinar los parámetros de requisitos de idoneidad del sistema indicando un criterio de aceptación de resolución mínimo de 2.0, la especificidad con el énfasis de analizar interferencias en los cromatogramas de interés de las diferentes soluciones empleadas, mientras que para la degradación forzada conlleva al sometimiento de la degradación por diferentes condiciones de estrés:

Soluciones estándar. Solución madre estándar (1.0 mg/ml). Se disolvieron 50.0 mg de ácido salicílico y se diluyeron a 50 ml con acetonitrilo.

Solución de referencia (0.01 mg/ml). Se disolvió 1,0 ml de Solución madre estándar hasta 100 ml con acetonitrilo. Luego, la solución preparada se filtró a través de un filtro de nailon de jeringa de 25 mm con un tamaño de poro de 0.45 µm y se transfirió a un vial.

Solución de adecuación del sistema (SSS). Se disolvieron 100.0 mg de ácido acetilsalicílico y se diluyeron a 10 ml con acetonitrilo. Se transfirieron 0.1 ml de esta solución y 0,5 ml de solución madre estándar a matraces de 50 ml y se diluyeron a volumen con acetonitrilo. La solución preparada se filtró a través de un filtro de nailon de jeringa de 25 mm con un tamaño de poro de 0.45 µm, luego se transfirió el volumen apropiado a un vial.

Solución de muestra para tabletas. Se pesaron 20 comprimidos y se pulverizaron finamente. Se transfirió un peso exacto del polvo que contenía 100 mg de ácido acetilsalicílico a un matraz de 50 ml, se diluyó con acetonitrilo, se agitó y se enrasó con acetonitrilo. La solución preparada se filtró a través de un filtro de nailon de jeringa de 25 mm con un tamaño de poro de 0.45 µm, luego se transfirió el volumen apropiado al vial.

Requisitos de idoneidad del sistema. Resolución: mínimo 2.0 entre los picos de ácido acetilsalicílico y ácido salicílico en el cromatograma de realizando seis inyecciones consecutivas de solución SSS.

Especificidad. Para el estudio de interferencias se analizaron cromatogramas de fase móvil, solución de referencia, solución de adecuación del sistema (SSS) y acetonitrilo. Además, se inyectaron las siguientes soluciones para cada dosificación: polvo de comprimido sin ácido acetilsalicílico preparado con los mismos excipientes que los de la formulación comercial y glicina, polvo de comprimido reconstituido, polvo de comprimido reconstituido enriquecido con ácido salicílico a la concentración de 0.05% y 0.30% (límite de especificación de una impureza desconocida y ácido salicílico, respectivamente). Se registraron los cromatogramas, se analizaron las respuestas de los picos, si se midió alguno, y se evaluó la interferencia de los picos. (p. 3)

Degradación forzada. El ácido acetilsalicílico se sometió a la siguiente degradación por estrés: condiciones ácidas, alcalinas, oxidativas e hidrolíticas, así como a la fotodegradación y la inducida térmicamente. El comprimido placebo (polvo de comprimido sin ácido acetilsalicílico preparado con los mismos excipientes que los de una formulación comercial) se sometió a las mismas condiciones de estrés. Para ello, a cada muestra se le añadieron los siguientes materiales (por separado): 25 ml de HCl 0.5 M, 25 ml de NaOH 0.5 M (neutralizado tras enfriar con 15 ml de HCl 0.5 M), 25 ml de agua purificada, 25 ml de 3% H₂O₂. Diez muestras se calentaron en un baño de agua durante 1 h a 100 °C. Posteriormente las muestras se aforaron hasta un volumen de 50 ml con acetonitrilo. Las soluciones preparadas se filtraron a través de filtros de jeringa de nailon de 25 mm con un tamaño de poro de 0.45 µm y se transfirieron los volúmenes apropiados a los viales. Un procedimiento separado se refería a la preparación de muestras sujetas a UV y degradación térmica. Para ello, las muestras se transfirieron a cajas petri y se mantuvieron en una cámara de fotoestabilidad durante 8 h o en una estufa a 105 °C durante 2 h. (p. 4)

Los resultados para cada uno de los parámetros mencionados son:

Idoneidad del sistema. La resolución entre los picos SA y ASA también mostró el cumplimiento de los límites (por encima de 2.0), ver “Tabla E1”.

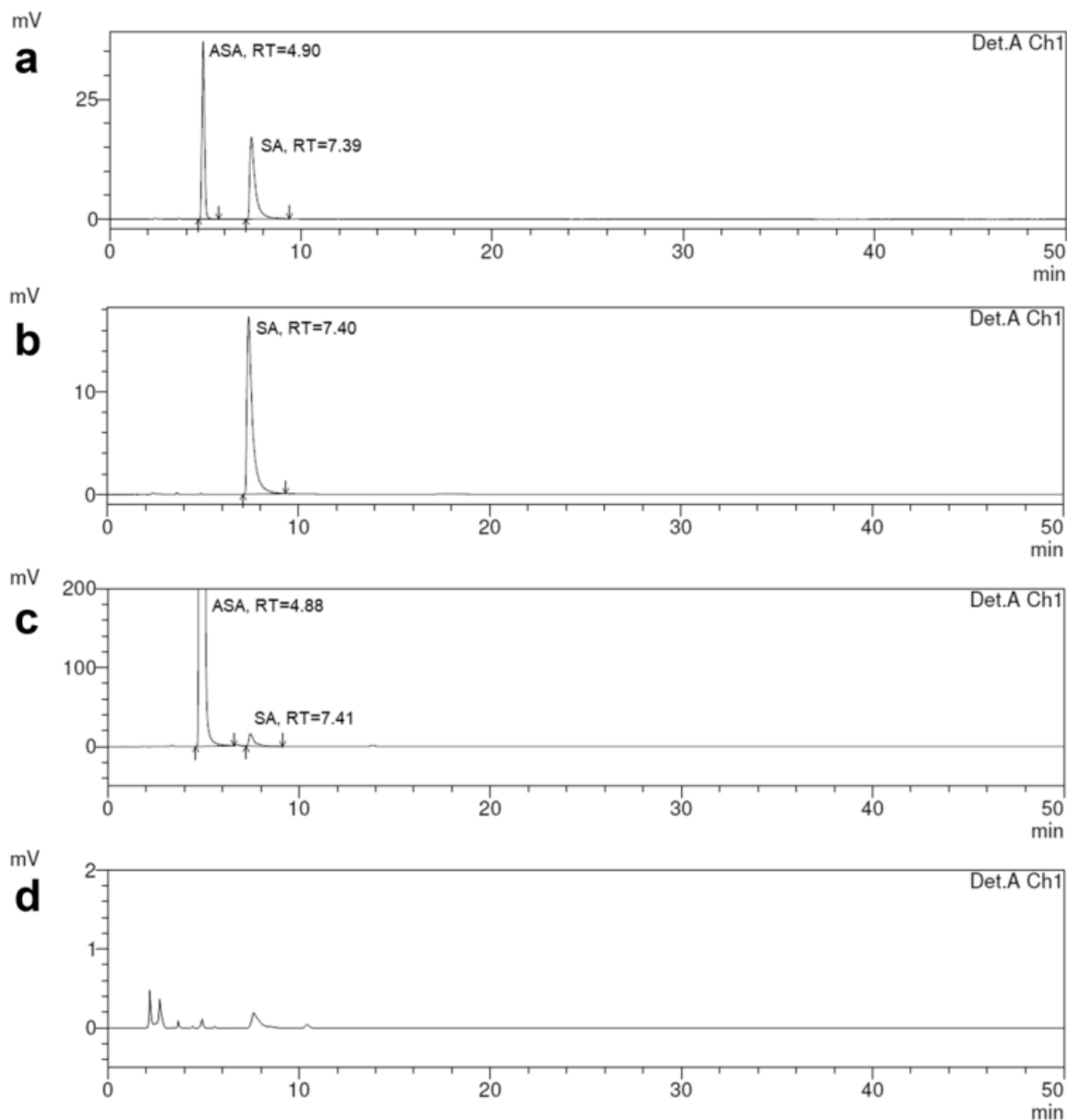
Tabla E1. Parámetros de idoneidad

Inyección	Área del pico		Tiempo de retención		Platos teóricos		Resolución
	ASA	SA	ASA	SA	ASA	SA	Picos ASA y SA
1	344408	338225	4.9	7.4	6031	4354	7.2
2	343268	338263	4.9	7.4	6063	4368	7.2
3	343709	338257	4.9	7.4	6068	4377	7.2
4	342684	337322	4.9	7.4	6109	4387	7.2
5	342581	336785	4.9	7.4	6108	4389	7.2
6	342338	337350	4.9	7.4	6117	4396	7.2
Promedio	343165	337700	4.9	7.4	6083	4379	7.2
s	788		0.0	0.0		16	0.0
CV	0.2		0.1	0.1		0.4	0.2

Especificidad. Los cromatogramas obtenidos confirmaron la especificidad del método. Se observó cualquier pico de interferencia derivado del placebo, la glicina, la fase móvil o el disolvente de la muestra. Los cromatogramas ejemplares se presentan en la Figura 4.

Figura 4

Cromatogramas ejemplares



Nota. La figura representa: **(a)** Solución SSS, **(b)** Solución de referencia, **(c)** Solución que contiene tableta reconstituida (75 mg ASA, 40 mg Gly) enriquecido con ácido salicílico a una concentración de 0.05% y **(d)** placebo de dosificación de 100 mg de ASA y 40 mg de solución de GLY. Adaptado de Kowalska, M., Woźniak, M., Kijek, M., Mitrosz, P., Szakiel, J., & Turek, P. (2022). Management of validation of HPLC method for determination of acetylsalicylic acid impurities in a new pharmaceutical product. *Scientific Reports*, 12(1), 1. (p. 6)

Degradación forzada. Los estudios de degradación forzada generalmente se realizan para establecer vías de degradación de sustancias y productos farmacéuticos. Además, un factor importante de este estudio es diferenciar los productos de degradación, que se generan a partir del placebo y que están relacionados con la sustancia del fármaco. El resumen de los estudios de degradación se presentó en la “Tabla E2”.

Tabla E2. Tiempo de retención de los productos de degradación para ASA (min)

Condiciones de degradación	Tiempo de retención de los productos de degradación para ASA (min)	Tiempo de retención de productos de degradación para excipientes (min)
Degradación ácida (25 mL de HCl 0,5 M, 1 h, 100 °C)	7.4 (SA), 13.0, 19.4	-
Degradación alcalina (25 mL de NaOH 0,5 M, 1 h, 100 °C)	7.4 (SA), 33.9	3.8, 4.2, 6.9
Degradación neutra (25 mL de H ₂ O, 1 h, 100 °C)	7.4 (SA), 13.0, 19.0, 34.5	-
Degradación oxidativa (25 mL de H ₂ O ₂ al 3 %, 1 h, 100 °C)	7.4 (SA), 13.0	-
Degradación fotolítica (UV, 8 h)	7.4 (SA), 6.5, 11.4, 12.9	-
Degradación por calor seco (105 °C, 2 h)	7.4 (SA), 6.5, 11.4, 12.9, 34.2, 36.1	-

En conclusión, Kowalska et al (2022) sugiere que:

El estudio de degradación forzada confirmó que no hubo fusión de los picos de los ingredientes activos ni del ácido salicílico con los de ningún otro producto de degradación. Además, se observaron los picos de interferencia derivados del placebo, la glicina, la fase móvil y el disolvente de la muestra. Los resultados anteriores confirman claramente la adecuada selectividad y sensibilidad del procedimiento. El método propuesto, puede ser utilizado en análisis de rutina de formulación de fármacos con ácido acetilsalicílico y glicina.

Por lo tanto, el método fue validado con éxito.

Exactitud del método

Determinación de la exactitud en los métodos analíticos comprendidos en la categoría I

- I. Preparar por lo menos un sextuplicado de placebos o muestras adicionadas de manera independiente. Dichas muestras deben contener todos los componentes del producto y además se le debe adicionar la concentración del analito que represente el 100 %.
- II. Analizar las muestras preparadas bajo las mismas condiciones de medición indicadas en el método analítico. ^[9]

Análisis de datos de exactitud del método

- I. Reportar la respuesta analítica mediante el porcentaje de recobro (% *R*).
- II. Calcular el valor del promedio aritmético (\bar{x}), la desviación estándar (*s*), el coeficiente de variación (*CV*) y el sesgo por medio del intervalo de confianza para la media poblacional $IC(\mu)$ del porcentaje de recobro (% *R*). ^[3, 9]

Criterios de aceptación de exactitud del método

El *CV* del porcentaje de recobro:

- *No mayor a 2.0 % si el método es cromatográfico.* ^[1, 3, 4, 5]

El $IC(\mu)$ debe incluir el 100% o que el promedio aritmético del porcentaje de recobro se incluya en el intervalo:

- *98.0 % — 102.0 % si el método es cromatográfico.* ^[3]

Ejemplo práctico de exactitud del método

Se preparan de forma independiente seis muestras adicionadas de analito a una concentración de 1.0 mg/mL correspondiente al 100 % de la concentración a evaluar.

EXACTITUD DEL MÉTODO

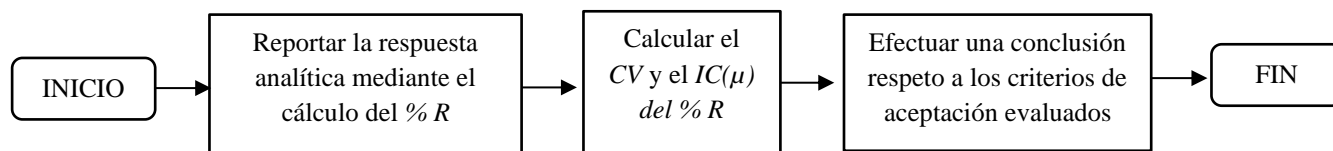
Inyección	Nombre de la muestra	Área (AU)
1	Muestra adicionada M1	343359
2	Muestra adicionada M2	344675
3	Muestra adicionada M3	346508
4	Muestra adicionada M4	347289
5	Muestra adicionada M5	344165
6	Muestra adicionada M6	346475

Cálculos

Fórmulas empleadas

- Concentración recuperada [C_{RE}] y porcentaje de recobro (% R).
- Promedio aritmético (\bar{x}), desviación estándar (s), coeficiente de variación (CV) e intervalo de confianza para la media poblacional $IC(\mu)$.

Diagrama de procesamiento de datos



Desarrollo de cálculos

1. Cálculo de concentración recuperada [C_{RE}].

$$\left(1. \frac{343359 \times 1.0 \frac{mg}{mL}}{345747} = 0.9931 \frac{mg}{mL}\right), \left(2. \frac{344675 \times 1.0 \frac{mg}{mL}}{345747} = 0.9969 \frac{mg}{mL}\right), \left(3. \frac{346508 \times 1.0 \frac{mg}{mL}}{345747} = 1.0022 \frac{mg}{mL}\right)$$

$$\left(4. \frac{347289 \times 1.0 \frac{mg}{mL}}{345747} = 1.0045 \frac{mg}{mL}\right), \left(5. \frac{344165 \times 1.0 \frac{mg}{mL}}{345747} = 0.9954 \frac{mg}{mL}\right), \left(6. \frac{346475 \times 1.0 \frac{mg}{mL}}{345747} = 1.0021 \frac{mg}{mL}\right)$$

2. Cálculo del porcentaje de recobro (% R).

$$\left(1. \frac{0.9931 \frac{mg}{mL}}{1.0 \frac{mg}{mL}} \times 100 \% = 99.31 \%\right), \left(2. \frac{0.9969 \frac{mg}{mL}}{1.0 \frac{mg}{mL}} \times 100 \% = 99.69 \%\right), \left(3. \frac{1.0022 \frac{mg}{mL}}{1.0 \frac{mg}{mL}} \times 100 \% = 100.22 \%\right)$$

$$\left(4. \frac{1.0045 \frac{mg}{mL}}{1.0 \frac{mg}{mL}} \times 100 \% = 100.45 \%\right), \left(5. \frac{0.9954 \frac{mg}{mL}}{1.0 \frac{mg}{mL}} \times 100 \% = 99.54 \%\right), \left(6. \frac{1.0021 \frac{mg}{mL}}{1.0 \frac{mg}{mL}} \times 100 \% = 100.21 \%\right)$$

Inyección	Concentración adicionada (mg/mL)	Concentración recuperada (mg/mL)	% R
1	1.0000	0.9931	99.31
2	1.0000	0.9969	99.69
3	1.0000	1.0022	100.22
4	1.0000	1.0045	100.45
5	1.0000	0.9954	99.54
6	1.0000	1.0021	100.21

3. Cálculo de Σx , promedio aritmético (\bar{x}), desviación estándar (s) y coeficiente de variación (CV) del porcentaje de recobro ($\% R$).

$$\Sigma \bar{x} = 99.31 \% + 99.69 \% + 100.22 + 100.45 + 99.54 + 100.21 \% = 599.42 \%$$

$$n = 6$$

$$\bar{x} = 599.42 \% / 6 = 99.90 \%$$

$$\Sigma(x - \bar{x})^2 = (99.31 - 99.90)^2 + (99.69 - 99.90)^2 + (100.22 - 99.90)^2 + (100.45 - 99.90)^2 + (99.54 - 99.90)^2 + (100.21 - 99.90)^2 = 1.0228$$

$$s = \sqrt{\frac{1.0228}{6 - 1}} = 0.45$$

$$CV = \frac{0.45}{99.85} \times 100 \% = 0.45 \approx 0.5 \%$$

EXACTITUD DEL MÉTODO	
Inyección	% R
1	99.31
2	99.69
3	100.22
4	100.45
5	99.54
6	100.21
\bar{x}	99.90
s	0.45
CV	0.5

4. Cálculo del intervalo de confianza para la media poblacional $IC(\mu)$.

$$IC(\mu) = 99.9 \% - 2.571 \times \frac{0.45}{\sqrt{6}} = 99.43 \% \approx 99.4 \%$$

$$IC(\mu) = 99.9 \% + 2.571 \times \frac{0.45}{\sqrt{6}} = 100.37 \% \approx 100.4 \%$$

INTERVALO DE CONFIANZA PARA LA MEDIA POBLACIONAL $IC(\mu)$

IC (μ)	99.4	100.4
--------------	------	-------

Criterio de aceptación

Criterio de aceptación	Resultado	Conclusión
CV del porcentaje de recobro no mayor a 2.0 %	$CV = 0.5 \%$	Cumple
El $IC(\mu)$ debe incluir el 100% o que el promedio aritmético del porcentaje de recobro se incluya en el intervalo: 98.0 % — 102.0 %	$IC(\mu) = 99.4 \% — 100.4$	Cumple

Linealidad e intervalo del método

Determinación de linealidad e intervalo del método

- I. Preparar al menos tres niveles de concentración del analito por triplicado, a partir de una muestra (placebo o muestra adicionada de analito) para ser analizadas aplicando el método analítico, ya sea por dilución o por pesada independiente. ^[9]
- II. Considerar el siguiente intervalo, es necesario que el intervalo incluya los límites de especificación de la aplicación analítica del método:
 - a. **Cuantificación de un fármaco** (materia prima o producto terminado): De 80 a 120 % del contenido del marbete. ^[9, 15, 16]
- III. Analizar las muestras preparadas bajo las mismas condiciones de medición para cada nivel de concentración adicionada.

Análisis de datos de linealidad e intervalo del método

- I. Graficar los valores de respuesta analítica obtenida en función de cada uno de los valores de concentración adicionada vs concentración recuperada y por medio de un examen visual, determinar una posible relación lineal
- II. Llevar a cabo el ajuste por mínimos cuadrados de la relación lineal, entre concentración adicionada (x), y concentración recuperada (y).
- III. Evaluar la calidad de ajuste por medio del cálculo del coeficiente de determinación (r^2) la desviación estándar de la regresión ($s_{y/x}$) y el coeficiente de variación de regresión ($CV_{y/x}$), reportar el sesgo del ajuste mediante el intervalo de confianza de la pendiente $IC(\beta_1)$ y el intervalo de confianza de la ordenada al origen $IC(\beta_0)$. ^[9]
- IV. Evaluar la exactitud del porcentaje de recobro ($\% R$), por medio del cálculo del promedio aritmético (\bar{x}), la desviación estándar (s), y el coeficiente de variación (CV), reportar el sesgo por medio del intervalo de confianza para la media poblacional $IC(\mu)$ del porcentaje de recobro ($\% R$). ^[3, 9]

Criterios de aceptación de linealidad e intervalo del método

Concentración adicionada vs concentración recuperada.

- $r^2 \geq 0.98$. ^[3]
- $IC(\beta_1)$ debe incluir la unidad. ^[3, 4, 15]
- $IC(\beta_0)$ debe incluir el cero. ^[1, 3]
- $CV_{y/x}$ del porcentaje de recobro no debe ser mayor a 2.0 % si el método es cromatográfico. ^[3]

Porcentaje de recobro.

- El IC(μ) debe incluir el 100% o que el promedio aritmético del porcentaje de recobro (% R) se incluya en el intervalo de 98.0 % - 102.0 % si el método es cromatográfico. [1,3,4,5]
- El CV del porcentaje de recobro (% R) no debe ser mayor 2.0 % si el método es método cromatográfico. [3]

Ejemplo práctico de linealidad e intervalo del método

Se preparan por triplicado mediante el método de estándar adicionado una solución stock de referencia y de muestra adicionada de analito a una concentración de 2.0 mg/mL. De cada solución preparada, de forma independiente se toma una serie de alícuotas para preparar una curva de calibración (CC) con soluciones al 0.8, 1.0 y 1.2 mg/mL correspondientes al 80, 100 y 120 % respectivamente a la concentración del analito a evaluar.

LINEALIDAD DEL MÉTODO

Inyección	Nombre de la muestra	Concentración adicionada (mg/mL)	Área (AU)
1	Muestra adicionada 80% — CC 1	0.8	274969
2	Muestra adicionada 80% — CC 2	0.8	278469
3	Muestra adicionada 80% — CC 3	0.8	276512
4	Muestra adicionada 100% — CC 1	1.0	345163
5	Muestra adicionada 100% — CC 2	1.0	345470
6	Muestra adicionada 100% — CC 3	1.0	343792
7	Muestra adicionada 120% — CC 1	1.2	415778
8	Muestra adicionada 120% — CC 2	1.2	416532
9	Muestra adicionada 120% — CC 3	1.2	416328

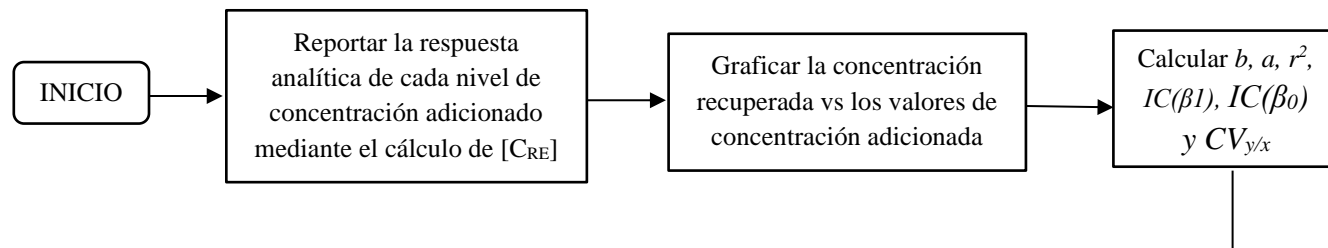
Cálculos

Fórmulas empleadas

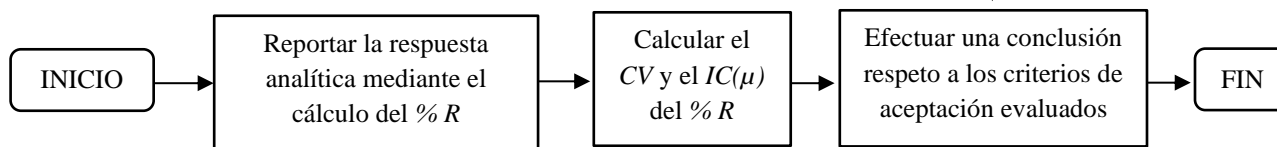
- Concentración recuperada [C_{RE}].
- Pendiente (b), ordenada al origen (a) y coeficiente de determinación (r^2).
- Intervalo de confianza para la pendiente IC(β_1), desviación estándar de la regresión ($s_{y/x}$) y desviación estándar de la pendiente (sb_1).
- Intervalo de confianza para la ordenada al origen IC(β_0), desviación estándar de la ordenada al origen (S_a).
- Coeficiente de variación de la regresión ($CV_{y/x}$)
- Porcentaje de recobro (% R), promedio aritmético (\bar{x}), desviación estándar (s), coeficiente de variación (CV) e intervalo de confianza para la media poblacional IC(μ).

Diagrama de procesamiento de datos

Concentración adicionada (x) vs concentración recuperada (y)



Porcentaje de recobro



Desarrollo de cálculos

Concentración adicionada (x) vs concentración recuperada (y)

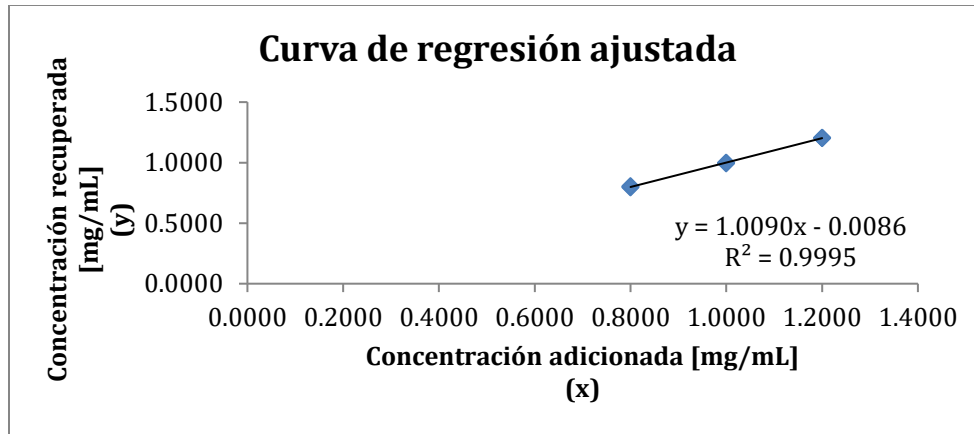
1. Cálculo de concentración recuperada [CRE].

$$\left(1. \frac{274969 \times 1.0 \frac{mg}{mL}}{345747} = 0.7953 \frac{mg}{mL}\right), \left(2. \frac{278469 \times 1.0 \frac{mg}{mL}}{345747} = 0.8054 \frac{mg}{mL}\right), \left(3. \frac{276512 \times 1.0 \frac{mg}{mL}}{345607} = 0.7998 \frac{mg}{mL}\right)$$

$$\left(4. \frac{345163 \times 1.0 \frac{mg}{mL}}{345747} = 0.9983 \frac{mg}{mL}\right), \left(5. \frac{345470 \times 1.0 \frac{mg}{mL}}{345747} = 0.9992 \frac{mg}{mL}\right), \left(6. \frac{343792 \times 1.0 \frac{mg}{mL}}{345607} = 1.9943 \frac{mg}{mL}\right)$$

$$\left(7. \frac{415778 \times 1.0 \frac{mg}{mL}}{345747} = 1.2025 \frac{mg}{mL}\right), \left(8. \frac{416532 \times 1.0 \frac{mg}{mL}}{345747} = 1.2047 \frac{mg}{mL}\right), \left(9. \frac{416328 \times 1.0 \frac{mg}{mL}}{345607} = 1.2041 \frac{mg}{mL}\right)$$

Inyección	Concentración adicionada (mg/mL) (x)	Concentración recuperada (mg/mL) (y)
1	0.8000	0.7953
2	0.8000	0.8054
3	0.8000	0.7998
4	1.0000	0.9983
5	1.0000	0.9992
6	1.0000	0.9943
7	1.2000	1.2025
8	1.2000	1.2047
9	1.2000	1.2041



2. Cálculo de Σx , Σy , Σxy , Σx^2 , Σy^2 y \bar{x} .

$$\Sigma x = 0.8 + 0.8 + 0.8 + 1.0 + 1.0 + 1.0 + 1.2 + 1.2 + 1.2 = 9.0$$

$$\Sigma y = 0.7953 + 0.8054 + 0.7998 + 0.9983 + 0.9992 + 0.9943 + 1.2025 + 1.2047 + 1.2041 = 9.0036$$

$$\Sigma xy = (0.8 \times 0.7953) + (0.8 \times 0.8054) + (0.8 \times 0.7998) + (1.0 \times 0.9983) + (1.0 \times 0.9992) + (1.0 \times 0.9943) + (1.2 \times 1.2025) + (1.2 \times 1.2047) + (1.2 \times 1.2041) = 9.24576$$

$$\Sigma x^2 = 0.8^2 + 0.8^2 + 0.8^2 + 1.0^2 + 1.0^2 + 1.0^2 + 1.2^2 + 1.2^2 + 1.2^2 = 9.24$$

$$\Sigma y^2 = 0.7953^2 + 0.8054^2 + 0.7998^2 + 0.9983^2 + 0.9992^2 + 0.9943^2 + 1.2025^2 + 1.2047^2 + 1.2041^2 = 9.25165246$$

$$n = 9$$

$$\bar{x} = 9/9 = 1$$

3. Cálculo de la pendiente (b), ordenada al origen (a) y coeficiente de determinación (r^2).

$$b = \frac{(9 \times 9.24576) - (9.0 \times 9.0036)}{(9 \times 9.24) - (9.0)^2} = 1.0090$$

$$a = \frac{9.0036 - (1.0090 \times 9.0)}{9} = -0.0086$$

$$r^2 = \frac{[(9 \times 9.24576) - (9.0 \times 9.0036)]^2}{[(9 \times 9.24) - (9)^2] \times [(9 \times 9.25165246) - (9.0036)^2]} = 0.9995$$

4. Cálculo de la desviación estándar de la regresión ($S_{y/x}$), desviación estándar de la pendiente (sb_1) para el intervalo de confianza para la pendiente $IC(\beta_1)$.

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{9.25165246 - (1.0090 \times 9.24576) - (-0.0086 \times 9.0036)}{9 - 2}} = 0.00399$$

$$sb_1 = 0.00399 \sqrt{\frac{1}{9.24 - \frac{(9)^2}{9}}} = 0.0081$$

$$IC(\beta_1) = 1.0090 - 2.365 \times 0.0081 = 0.9898$$

$$IC(\beta_1) = 1.0090 + 2.365 \times 0.0081 = 1.0282$$

INTERVALO DE CONFIANZA PARA LA PENDIENTE

IC(β_1)	0.9898	1.0282
-----------------	--------	--------

5. Cálculo de la desviación estándar de la ordenada al origen (S_a) para el intervalo de confianza para la ordenada al origen $IC(\beta_0)$.

$$S_a = 0.00399 \sqrt{\frac{1}{9} + \frac{(1)^2}{9.24 - \frac{9.0^2}{9}}} = 0.0083$$

$$IC(\beta_0) = -0.0086 - 2.365 \times 0.0083 = -0.0282$$

$$IC(\beta_0) = -0.0086 + 2.365 \times 0.0083 = 0.0110$$

INTERVALO DE CONFIANZA PARA LA ORDENADA AL ORIGEN

IC(β_0)	-0.0282	0.0110
-----------------	---------	--------

6. Cálculo del coeficiente de variación de la regresión ($CV_{y/x}$).

$$CV_{y/x} = 0.00399/1 \times 100 \% = 0.399 \% \approx 0.4 \%$$

Porcentaje de recobro

1. Cálculo del porcentaje de recobro (% R).

$$\left(1. \frac{0.7953 \frac{mg}{mL}}{0.8 \frac{mg}{mL}} \times 100 \% = 99.41 \%\right), \left(2. \frac{0.8054 \frac{mg}{mL}}{0.8 \frac{mg}{mL}} \times 100 \% = 100.68 \%\right), \left(3. \frac{0.7998 \frac{mg}{mL}}{0.8 \frac{mg}{mL}} \times 100 \% = 99.98 \%\right)$$

$$\left(4. \frac{0.9983 \frac{mg}{mL}}{1.0 \frac{mg}{mL}} \times 100 \% = 99.83 \%\right), \left(5. \frac{0.9992 \frac{mg}{mL}}{1.0 \frac{mg}{mL}} \times 100 \% = 99.92 \%\right), \left(6. \frac{0.9943 \frac{mg}{mL}}{1.0 \frac{mg}{mL}} \times 100 \% = 99.43 \%\right)$$

$$\left(7. \frac{1.2025 \frac{mg}{mL}}{1.2 \frac{mg}{mL}} \times 100 \% = 100.21 \%\right), \left(8. \frac{1.2047 \frac{mg}{mL}}{1.2 \frac{mg}{mL}} \times 100 \% = 100.39 \%\right), \left(9. \frac{1.2041 \frac{mg}{mL}}{1.2 \frac{mg}{mL}} \times 100 \% = 100.34 \%\right)$$

Inyección	Concentración adicionada (mg/mL)	Concentración recuperada (mg/mL)	% Recobro
1	0.8000	0.7953	99.41
2	0.8000	0.8054	100.68
3	0.8000	0.7998	99.98
4	1.0000	0.9983	99.83
5	1.0000	0.9992	99.92
6	1.0000	0.9943	99.43
7	1.2000	1.2025	100.21
8	1.2000	1.2047	100.39
9	1.2000	1.2041	100.34

2. Cálculo de Σx , promedio aritmético (\bar{x}), desviación estándar (s) y coeficiente de variación (CV) del porcentaje de recobro (% R).

$$\Sigma \bar{x} = 99.41 \% + 100.68 \% + 99.98 \% + 99.83 \% + 99.92 \% + 99.43 \% + 100.21 \% + 100.39 \% + 100.34 \% = 900.19 \%$$

$$n = 6$$

$$\bar{x} \text{ del área} = 900.19 \% / 9 = 100.02 \%$$

$$\begin{aligned} \Sigma(x - \bar{x})^2 &= (99.41 - 100.02)^2 + (100.68 - 100.02)^2 + (99.98 - 100.02)^2 + (99.83 - 100.02)^2 \\ &+ (99.92 - 100.02)^2 + (99.43 - 100.02)^2 + (100.21 - 100.02)^2 + (100.39 - 100.02)^2 \\ &+ (100.34 - 100.02)^2 = 1.4789 \end{aligned}$$

$$s = \sqrt{\frac{1.4789}{9 - 1}} = 0.43$$

$$CV = \frac{0.43}{100.02 \%} \times 100 \% = 0.43 \approx 0.4 \%$$

PORCENTAJE DE RECOBRO DE LINEALIDAD DEL MÉTODO

Inyección	% R
1	99.41
2	100.68
3	99.98
4	99.83
5	99.92
6	99.43
7	100.21
8	100.39
9	100.34
\bar{x}	100.02
s	0.43
CV	0.4

3. Cálculo del intervalo de confianza para la media poblacional

$$IC(\mu) = 100.02 \% - 2.306 \times \frac{0.43}{\sqrt{9}} = 99.69 \% \approx 99.7 \%$$

$$IC(\mu) = 100.02 \% + 2.306 \times \frac{0.43}{\sqrt{9}} = 100.35 \% \approx 100.4 \%$$

INTERVALO DE CONFIANZA PARA LA MEDIA POBLACIONAL

IC(β_1)	99.7 %	100.4 %
-----------------	--------	---------

Criterio de aceptación

Criterio de aceptación	Resultado de concentración adicionada vs concentración recuperada	Conclusión
$r^2 = \geq 0.98$	$r^2 \geq 0.9995$	Cumple
IC (β_1) debe incluir la unidad	IC(β_1) = 0.9898 — 1.0282, incluye la unidad	Cumple
IC(β_0) debe incluir el cero	IC(β_0) = -0.0282 — 0.0110, incluye el cero	Cumple
CV _{y/x} del porcentaje de recobro no debe ser mayor a 2.0 %	CV _{y/x} = 0.4 %	Cumple

Criterio de aceptación	Resultado del porcentaje de recobro	Conclusión
El CV del porcentaje de recobro no debe ser mayor 2.0 %	CV = 0.4 %	Cumple
El IC(μ) debe incluir el 100% o que el promedio aritmético del porcentaje de recobro se incluya en el intervalo de 98.0 % - 102.0 %	IC(μ) = 99.7 % — 100.4	Cumple

Precisión del método

Determinación de repetibilidad

- I. A partir de los resultados de la exactitud del método (porcentaje de recobro) o de la linealidad e intervalo del método (porcentaje de recobro) y la relación de la concentración adicionada contra la concentración recuperada. ^[9]

Análisis de datos de repetibilidad

- I. Evaluar la repetibilidad en caso de seleccionar el parámetro de:
 - b) Exactitud:
 - Con el coeficiente de variación (CV) del porcentaje de recobro ($\% R$) del analito.
 - c) Linealidad e intervalo del método:
 - Con el coeficiente de variación (CV) del porcentaje de recobro ($\% R$) del analito.
 - Con el coeficiente de variación de la relación concentración adicionada contra concentración adicionada ($CV_{y/x}$). ^[9]

Criterios de aceptación de repetibilidad

En el caso de haber seleccionado los datos de *Exactitud del método*:

- *Cumplir los criterios de aceptación establecidos para dicho parámetro.*

En caso de haber seleccionado los datos de *Linealidad e intervalo del método*:

- *Cumplir los criterios de aceptación establecidos para dicho parámetro.* ^[9]

Determinación de reproducibilidad intralaboratorio (Precisión intermedia)

- I. Realizar el análisis de por lo menos tres alícuotas (muestras analíticas indicadas en el método a un nivel de concentración del 100%) tomadas de una muestra homogénea; para ser analizadas en diferentes días (mínimo dos) y por dos diferentes analistas (mínimo dos).
- II. Analizar las muestras preparadas bajo las mismas condiciones de medición indicadas en el método analítico. ^[9]

Análisis de datos de reproducibilidad intralaboratorio (Precisión intermedia)

- I. Reportar la respuesta analítica mediante el porcentaje de recobro ($\% R$).
- II. Calcular el valor del promedio aritmético (\bar{x}), la desviación estándar (s) y el coeficiente de variación (CV) del porcentaje de recobro ($\% R$) de todos los resultados analíticos obtenidos. ^[9]
- III. Verificar la significancia estadística de los datos mediante una prueba de ANOVA de un factor, formulando una hipótesis nula (H_0) para indicar que hay igualdad y una hipótesis alterna (H_1) para indicar que no hay igualdad, con un nivel de significancia de 0.05. ^[4]

Criterios de aceptación de reproducibilidad intralaboratorio (Precisión intermedia)

- $CV \leq 2.0 \%$ para métodos cromatográficos. [3]

Ejemplo práctico de precisión del método

Repetibilidad

A partir de los resultados obtenidos de la exactitud del método, se evaluó la repetibilidad.

EXACTITUD DEL MÉTODO (Repetibilidad)	
Inyección	%R
1	99.31
2	99.69
3	100.22
4	100.45
5	99.54
6	100.21
\bar{x}	99.90
s	0.45
CV	0.5

Reproducibilidad intralaboratorio (Precisión intermedia)

Se prepara por triplicado una muestra adicionada de analito a una concentración de 1 mg/mL correspondiente al 100 % de la concentración a evaluar, por dos analistas en dos días diferentes.

REPRODUCIBILIDAD INTRALABORATORIO (PRECISIÓN INTERMEDIA)		
Dato	Nombre de la muestra	Área (AU)
1	Muestra adicionada A1-D1	343999
2	Muestra adicionada A1-D1	346032
3	Muestra adicionada A1-D1	344350
4	Muestra adicionada A2-D1	345983
5	Muestra adicionada A2-D1	348348
6	Muestra adicionada A2-D1	346887
7	Muestra adicionada A1-D2	348677
8	Muestra adicionada A1-D2	344194
9	Muestra adicionada A1-D2	347828
10	Muestra adicionada A2-D2	342552
11	Muestra adicionada A2-D2	345852
12	Muestra adicionada A2-D2	348209

Cálculos

Fórmulas empleadas

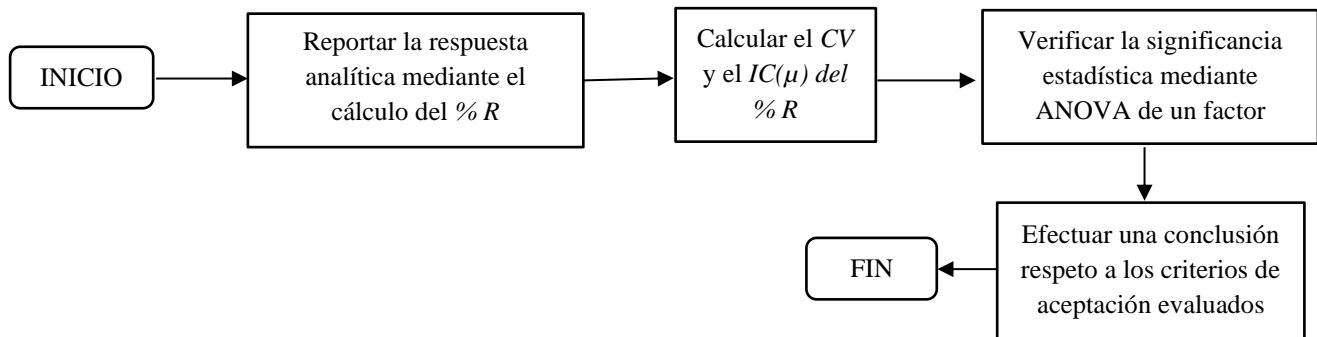
- Concentración recuperada [C_{RE}] y porcentaje de recobro (% R).
- Promedio aritmético (\bar{x}), desviación estándar (s), coeficiente de variación (CV) e intervalo de confianza para la media poblacional $IC(\mu)$.
- ANOVA de un factor.

Diagrama de procesamiento de datos

Repetibilidad

- Ver el diagrama de procesamiento de datos de *Exactitud del método* o *Linealidad e Intervalo del método*, según se haya evaluado.

Reproducibilidad intralaboratorio (Precisión intermedia)



Desarrollo de cálculos

1. Cálculo de concentración recuperada [C_{RE}].

$$\begin{aligned}
 & \left(1. \frac{343999 \times 1.0 \frac{mg}{mL}}{345747} = 0.9949 \frac{mg}{mL} \right), \left(2. \frac{346032 \times 1.0 \frac{mg}{mL}}{345747} = 1.0008 \frac{mg}{mL} \right), \left(3. \frac{344530 \times 1.0 \frac{mg}{mL}}{345747} = 0.9960 \frac{mg}{mL} \right) \\
 & \left(4. \frac{345983 \times 1.0 \frac{mg}{mL}}{344911} = 1.0031 \frac{mg}{mL} \right), \left(5. \frac{348348 \times 1.0 \frac{mg}{mL}}{344911} = 1.0100 \frac{mg}{mL} \right), \left(6. \frac{346887 \times 1.0 \frac{mg}{mL}}{344911} = 1.0057 \frac{mg}{mL} \right) \\
 & \left(7. \frac{348677 \times 1.0 \frac{mg}{mL}}{345607} = 1.0089 \frac{mg}{mL} \right), \left(8. \frac{344194 \times 1.0 \frac{mg}{mL}}{345607} = 0.9959 \frac{mg}{mL} \right), \left(9. \frac{347828 \times 1.0 \frac{mg}{mL}}{345607} = 1.0064 \frac{mg}{mL} \right) \\
 & \left(10. \frac{342552 \times 1.0 \frac{mg}{mL}}{345891} = 0.9903 \frac{mg}{mL} \right), \left(11. \frac{345852 \times 1.0 \frac{mg}{mL}}{345891} = 0.9999 \frac{mg}{mL} \right), \left(12. \frac{348209 \times 1.0 \frac{mg}{mL}}{345891} = 1.0067 \frac{mg}{mL} \right)
 \end{aligned}$$

2. Cálculo del porcentaje de recobro (% R).

$$\left(1. \frac{0.9949 \frac{mg}{mL}}{1.0 \frac{mg}{mL}} \times 100 \% = 99.49 \% \right), \left(2. \frac{1.0008 \frac{mg}{mL}}{1.0 \frac{mg}{mL}} \times 100 \% = 100.08 \% \right), \left(3. \frac{0.9960 \frac{mg}{mL}}{1.0 \frac{mg}{mL}} \times 100 \% = 99.60 \% \right)$$

$$\left(4. \frac{1.0031 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}}{1.0 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}} \times 100 \% = 100.31 \%\right), \left(5. \frac{1.0100 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}}{1.0 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}} \times 100 \% = 101.00 \%\right), \left(6. \frac{1.0057 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}}{1.0 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}} \times 100 \% = 100.57 \%\right)$$

$$\left(7. \frac{1.0089 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}}{1.0 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}} \times 100 \% = 100.89 \%\right), \left(8. \frac{0.9959 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}}{1.0 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}} \times 100 \% = 99.59 \%\right), \left(9. \frac{1.0064 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}}{1.0 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}} \times 100 \% = 100.64 \%\right)$$

$$\left(10. \frac{0.9903 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}}{1.0 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}} \times 100 \% = 99.03 \%\right), \left(11. \frac{0.9999 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}}{1.0 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}} \times 100 \% = 99.99 \%\right), \left(12. \frac{1.0067 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}}{1.0 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}} \times 100 \% = 100.67 \%\right)$$

3. Cálculo de Σx , promedio aritmético (\bar{x}), desviación estándar (s) y coeficiente de variación (CV) del porcentaje de recobro ($\% R$).

$$\Sigma \bar{x} = 99.49 \% + 100.08 \% + 99.60 \% + 100.31 \% + 101.00 \% + 100.57 \% + 100.89 \% + 99.59 \% + 100.64 \% + 99.03 \% + 99.99 \% + 100.67 \% = 1201.86 \%$$

$$n = 12$$

$$\bar{x} = 1201.86 \% / 12 = 100.16 \%$$

$$\Sigma(x - \bar{x})^2 = (99.49 - 100.16)^2 + (100.08 - 100.16)^2 + (99.60 - 100.16)^2 + (100.31 - 100.16)^2 + (101.00 - 100.16)^2 + (100.57 - 100.16)^2 + (100.89 - 100.16)^2 + (99.59 - 100.16)^2 + (100.64 - 100.16)^2 + (99.03 - 100.16)^2 + (99.99 - 100.16)^2 + (100.67 - 100.16)^2 = 4.3192$$

$$s = \sqrt{\frac{4.3192}{12 - 1}} = 0.63$$

$$CV = \frac{0.63}{100.16} \times 100 \% = 0.63 \approx 0.6 \%$$

Dato	Concentración adicionada (mg/mL)	Concentración recuperada (mg/mL)	% Recobro
1	1.0000	0.9949	99.49
2	1.0000	1.0008	100.08
3	1.0000	0.9960	99.60
4	1.0000	1.0031	100.31
5	1.0000	1.0100	101.00
6	1.0000	1.0057	100.57
7	1.0000	1.0089	100.89
8	1.0000	0.9959	99.59
9	1.0000	1.0064	100.64
10	1.0000	0.9903	99.03
11	1.0000	0.9999	99.99
12	1.0000	1.0067	100.67
		\bar{x}	100.16
		s	0.63
		CV	0.6

4. Cálculo de ANOVA de un factor (realizado conforme a lo indicado en el APENDICE 4).

Día	Analista	
	1	2
1	99.49	100.31
	100.08	101.00
	99.60	100.57
2	100.89	99.03
	99.59	99.99
	100.64	100.67

Análisis de varianza de un factor

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Analista 1	6	600.29	100.0483333	0.35645667
Analista 2	6	601.57	100.2616667	0.48001667

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre analistas	0.136533333	1	0.136533333	0.326	0.58037066	4.965
Dentro de los grupos	4.182366667	10	0.418236667			
Total	4.3189	11				

Hipótesis

Si $F_{cal} \geq F_{tab(1, g_{le})}$ indica que $H_0: \mu_1 = \mu_2 = \dots = \mu_i$

Si $F_{cal} < F_{tab(1, g_{le})}$ indica que H_1 : no todas las medias son iguales

La diferencia entre las medias no es estadísticamente significativa, ya que, la $F_{cal} \geq F_{tab(1, g_{le})}$ aceptando la H_0 que indica una igualdad entre las medias.

Criterio de aceptación

Criterio de aceptación	Resultado	Conclusión
Para la Repetibilidad el $CV \leq 2 \%$	$CV = 0.5 \%$	Cumple
Para la Reproducibilidad Intralaboratorio (Precisión intermedia) el $CV \leq 2 \%$	$CV = 0.6 \%$	Cumple

Tolerancia del método

Determinación de tolerancia del método

- I. Establecer aquellos factores ajenos al método como: diferentes equipos, lotes de reactivos, columnas, etc., que se puedan presentar al reproducir el método en otras condiciones.
- II. Fijar por lo menos dos condiciones de uso y analizar una misma muestra analítica homogénea indicada en el método a un nivel de concentración del 100% por lo menos por triplicado a cada condición. Se debe llevar a cabo la verificación del sistema y cumplir con los criterios de aceptación establecidos previo al análisis de cada condición fijada. [9]

Análisis de datos de tolerancia del método

- I. Reportar la respuesta analítica mediante el porcentaje de recobro (% *R*).
- II. Calcular el valor del promedio aritmético (\bar{x}), la desviación estándar (*s*) y el coeficiente de variación (*CV*) del porcentaje de recobro (% *R*) de todas las condiciones de uso fijadas.
- III. Evaluar las diferencias entre cada condición de uso. [9]

Criterio de aceptación de tolerancia del método

- $CV \leq 2.0\%$ para métodos cromatográficos. [3]

Ejemplo práctico de tolerancia del método

A partir de una misma muestra adicionada de analito preparada a una concentración de 1.0 mg/mL correspondiente al 100 % de la concentración a evaluar, se inyectaron 3 viales por cada factor analizado:

- 1er factor — Columna empleada en las previas características de desempeño de la validación del método analítico.
- 2do factor — Segunda columna empleada con las mismas características requeridas en el método analítico.

Previo a la inyección de las muestras preparadas, se verificó que se cumplieran los criterios de la Verificación del sistema — Aptitud del sistema ($CV \leq 2.0\%$, $k' > 1.5$, $T < 2.0$, $N \geq 2000$) para cada factor el área (AU) promedio de la solución de referencia corresponde a 345645 y 344861, respectivamente.

TOLERANCIA DEL MÉTODO

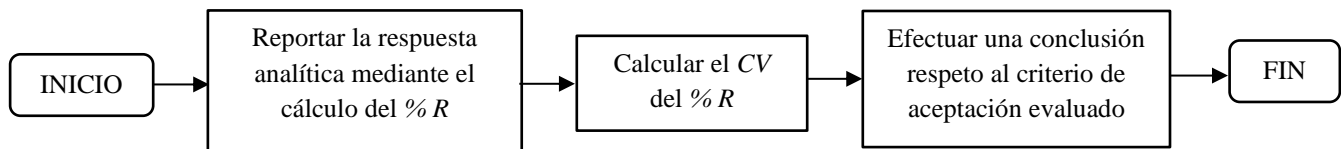
Dato	Nombre de la muestra	Área (AU)
1	Muestra adicionada 1 — Columna 1	347136
2	Muestra adicionada 2 — Columna 1	346257
3	Muestra adicionada 3 — Columna 1	348182
4	Muestra adicionada 1 — Columna 2	348061
5	Muestra adicionada 2 — Columna 2	347712
6	Muestra adicionada 3 — Columna 2	346116

Cálculos

Fórmulas empleadas

- Concentración recuperada [C_{RE}] y porcentaje de recobro (% R).
- Promedio aritmético (\bar{x}), desviación estándar (s) y coeficiente de variación (CV).

Diagrama de procesamiento de datos



Desarrollo de cálculos

1. Cálculo de concentración recuperada [C_{RE}].

$$\left(1. \frac{347136 \times 1.0 \frac{mg}{mL}}{345645} = 1.0043 \frac{mg}{mL}\right), \left(2. \frac{346257 \times 1.0 \frac{mg}{mL}}{345645} = 1.0018 \frac{mg}{mL}\right), \left(3. \frac{348182 \times 1.0 \frac{mg}{mL}}{344861} = 1.0073 \frac{mg}{mL}\right)$$

$$\left(4. \frac{348061 \times 1.0 \frac{mg}{mL}}{344861} = 1.0093 \frac{mg}{mL}\right), \left(5. \frac{347712 \times 1.0 \frac{mg}{mL}}{344861} = 1.0083 \frac{mg}{mL}\right), \left(6. \frac{346116 \times 1.0 \frac{mg}{mL}}{344861} = 1.0036 \frac{mg}{mL}\right)$$

2. Cálculo del porcentaje de recobro (% R).

$$\left(1. \frac{1.0043 \frac{mg}{mL}}{1.0 \frac{mg}{mL}} \times 100 \% = 100.43 \%\right), \left(2. \frac{1.0018 \frac{mg}{mL}}{1.0 \frac{mg}{mL}} \times 100 \% = 100.18 \%\right), \left(3. \frac{1.0073 \frac{mg}{mL}}{1.0 \frac{mg}{mL}} \times 100 \% = 100.73 \%\right)$$

$$\left(4. \frac{1.0093 \frac{mg}{mL}}{1.0 \frac{mg}{mL}} \times 100 \% = 100.93 \%\right), \left(5. \frac{1.0083 \frac{mg}{mL}}{1.0 \frac{mg}{mL}} \times 100 \% = 100.83 \%\right), \left(6. \frac{1.0036 \frac{mg}{mL}}{1.0 \frac{mg}{mL}} \times 100 \% = 100.36 \%\right)$$

3. Cálculo de Σx , promedio aritmético (\bar{x}), desviación estándar (s) y coeficiente de variación (CV) del porcentaje de recobro (% R).

$$\Sigma \bar{x} = 100.43 \% + 100.18 \% + 100.73 \% + 100.93 \% + 100.83 \% + 100.36 \% = 603.46 \%$$

$$n = 6$$

$$\bar{x} = 603.46 \% / 6 = 100.58 \%$$

$$\Sigma(x - \bar{x})^2 = (100.43 - 100.58)^2 + (100.18 - 100.58)^2 + (100.73 - 100.58)^2 + (100.93 - 100.58)^2 + (100.83 - 100.58)^2 + (100.36 - 100.58)^2 = 0.4384$$

$$s = \sqrt{\frac{0.4384}{6 - 1}} = 0.30$$

$$CV = \frac{0.30}{100.58} \times 100 \% = 0.30 \approx 0.3 \%$$

Dato	Concentración adicionada (mg/mL)	Concentración recuperada (mg/mL)	% R
1	1.0000	1.0043	100.43
2	1.0000	1.0018	100.18
3	1.0000	1.0073	100.73
4	1.0000	1.0093	100.93
5	1.0000	1.0083	100.83
6	1.0000	1.0036	100.36

Criterio de aceptación

Criterio de aceptación	Resultado	Conclusión
CV del porcentaje de recobro no mayor a 2.0 %	CV = 0.3 %	Cumple

Robustez del método

Establecer aquellos factores instrumentales (temperatura de la columna, presión en la columna, velocidad de flujo, etc.) y/o factores no instrumentales (pH de fases, proporción de fases móviles, etc.) que se consideren críticos. Para su investigación se pueden presentar los siguientes casos:

- a. Investigación de tres factores como máximo.
- b. Investigación de cuatro a siete factores. ^[9]

Determinación de la investigación de tres factores como máximo

- I. Definir 3 factores instrumentales o no instrumentales según aplique al método analítico.
- II. Establecer el nivel inferior y superior respecto del nivel normal de operación, estos deben de ser pequeños pero deliberados.
- III. Analizar una misma muestra analítica homogénea indicada en el método a un nivel de concentración del 100% por triplicado a cada nivel (inferior, normal y superior) esto debe ser realizado para cada uno de los factores a investigar. Se debe llevar a cabo la verificación del sistema y cumplir con los criterios de aceptación establecidos previo al análisis de cada nivel conforme al factor seleccionado. ^[9]

Análisis de datos de la investigación de tres factores como máximo

- I. Reportar la respuesta analítica por medio del porcentaje de recobro (% R).
- II. Calcular el promedio aritmético de los tres niveles (inferior, normal y superior) del porcentaje de recobro (% R) de los resultados del análisis de cada nivel conforme al factor seleccionado.
- III. Evaluar la diferencia absoluta porcentual de la media aritmética ($|d_i|$), respecto al nivel normal de cada factor seleccionado. ^[9]

Criterio de aceptación de investigación de tres factores como máximo

- $|d_i| \leq 2.0 \%$ con respecto a la condición normal para métodos cromatográficos. ^[3]

Ejemplo práctico del desarrollo por determinación de la investigación de tres factores como máximo

Se evalúa una serie de factores relacionados con las condiciones instrumentales o inherentes al método (velocidad de flujo, pH de la fase acuosa y temperatura de la columna). Dichos factores se fijan bajo el concepto de “cambios pequeños y deliberados” respecto al nivel normal de operación indicado en el método analítico a validar, conforme se indica a continuación:

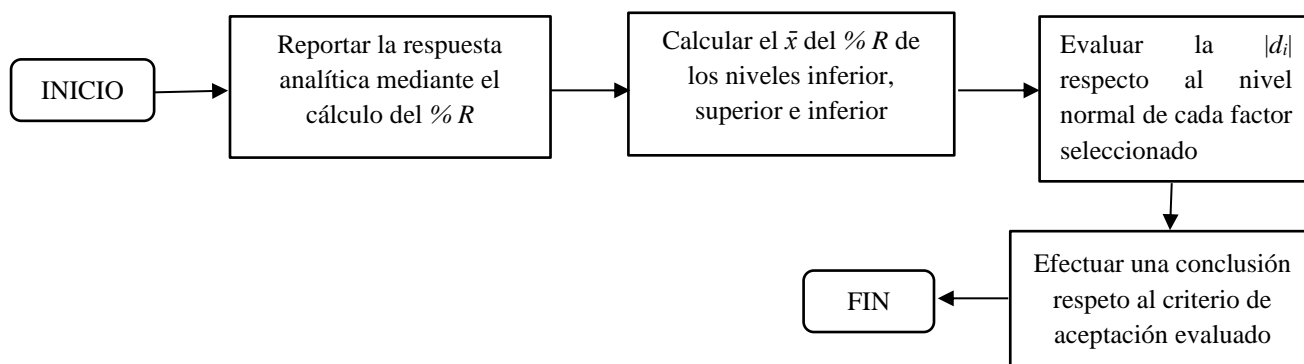
Análisis	Factor de análisis	Modificación
R0	Condición normal	Sin modificación
R1	Velocidad de flujo 1.0 mL/min	0.8 mL/min
R2	Velocidad de flujo 1.0 mL/min	1.2 mL/min

Análisis	Factor de análisis	Modificación
R3	pH 5.4	5.2
R4	pH 5.4	5.6
R5	Temperatura de columna 30 °C	28° C
R6	Temperatura de columna 30 °C	32° C

A partir de una misma muestra adicionada de analito preparada a una concentración de 1.0 mg/mL correspondiente al 100 % de la concentración a evaluar, inyectando por triplicado para cada factor analizado. Previo a la inyección de las viales preparados en cada análisis, se verifica que se cumplan los criterios aceptación dados en la Verificación del sistema — Aptitud del sistema ($CV \leq 2.0 \%$, $k' > 1.5$, $T < 2.0$, $N \geq 2000$) de una solución de referencia de concentración 1.0 mg/mL para cada análisis realizado, el área (AU) promedio corresponde a 345607, 353404, 315828, 353639, 336483, 316923 y 333061 para los análisis R0, R1, R2, R3, R4, R5 y R6 respectivamente.

Dato	Nombre de la muestra	Área (AU)	Dato	Nombre de la muestra	Área (AU)
1	Réplica 1 — R0	344328	13	Réplica 1 — R4	341093
2	Réplica 2 — R0	345732	14	Réplica 2 — R4	339822
3	Réplica 3 — R0	345485	15	Réplica 3 — R4	338125
4	Réplica 1 — R1	354100	16	Réplica 1 — R5	322126
5	Réplica 2 — R1	355836	17	Réplica 2 — R5	321390
6	Réplica 3 — R1	356222	18	Réplica 3 — R5	320079
7	Réplica 1 — R2	311278	19	Réplica 1 — R6	327116
8	Réplica 2 — R2	310412	20	Réplica 2 — R6	327790
9	Réplica 3 — R2	309282	21	Réplica 3 — R6	326468
10	Réplica 1 — R3	350159			
11	Réplica 2 — R3	351437			
12	Réplica 3 — R3	348860			

Diagrama de procesamiento de datos



Desarrollo de cálculos

Fórmulas empleadas

- Concentración recuperada [C_{RE}] y porcentaje de recobro (% R).
- Promedio aritmético (\bar{x}) y diferencia absoluta porcentual $|d_i|$.

1. Cálculo de concentración recuperada [C_{RE}].

$$\left(1. \frac{344328 \times 1.0 \frac{mg}{mL}}{345607} = 0.9963 \frac{mg}{mL}\right), \left(2. \frac{345732 \times 1.0 \frac{mg}{mL}}{345607} = 1.0004 \frac{mg}{mL}\right), \left(3. \frac{345485 \times 1.0 \frac{mg}{mL}}{345607} = 0.9996 \frac{mg}{mL}\right)$$

$$\left(4. \frac{354100 \times 1.0 \frac{mg}{mL}}{353404} = 1.0020 \frac{mg}{mL}\right), \left(5. \frac{355836 \times 1.0 \frac{mg}{mL}}{353404} = 1.0069 \frac{mg}{mL}\right), \left(6. \frac{356222 \times 1.0 \frac{mg}{mL}}{353404} = 1.0080 \frac{mg}{mL}\right)$$

$$\left(7. \frac{311278 \times 1.0 \frac{mg}{mL}}{315828} = 0.9856 \frac{mg}{mL}\right), \left(8. \frac{310412 \times 1.0 \frac{mg}{mL}}{315828} = 0.9829 \frac{mg}{mL}\right), \left(9. \frac{309282 \times 1.0 \frac{mg}{mL}}{315828} = 0.9793 \frac{mg}{mL}\right)$$

$$\left(10. \frac{350159 \times 1.0 \frac{mg}{mL}}{353639} = 0.9902 \frac{mg}{mL}\right), \left(11. \frac{351437 \times 1.0 \frac{mg}{mL}}{353639} = 0.9938 \frac{mg}{mL}\right), \left(12. \frac{348860 \times 1.0 \frac{mg}{mL}}{353639} = 0.9865 \frac{mg}{mL}\right)$$

$$\left(13. \frac{341093 \times 1.0 \frac{mg}{mL}}{336483} = 1.0137 \frac{mg}{mL}\right), \left(14. \frac{339822 \times 1.0 \frac{mg}{mL}}{336483} = 1.0099 \frac{mg}{mL}\right), \left(15. \frac{338125 \times 1.0 \frac{mg}{mL}}{336483} = 1.0049 \frac{mg}{mL}\right)$$

$$\left(16. \frac{322126 \times 1.0 \frac{mg}{mL}}{316923} = 1.0164 \frac{mg}{mL}\right), \left(17. \frac{321390 \times 1.0 \frac{mg}{mL}}{316923} = 1.0141 \frac{mg}{mL}\right), \left(18. \frac{320079 \times 1.0 \frac{mg}{mL}}{316923} = 1.0100 \frac{mg}{mL}\right)$$

$$\left(19. \frac{327116 \times 1.0 \frac{mg}{mL}}{333061} = 0.9821 \frac{mg}{mL}\right), \left(20. \frac{327790 \times 1.0 \frac{mg}{mL}}{333061} = 0.9842 \frac{mg}{mL}\right), \left(21. \frac{326468 \times 1.0 \frac{mg}{mL}}{333061} = 0.9802 \frac{mg}{mL}\right)$$

2. Cálculo del porcentaje de recobro (% R).

$$\left(1. \frac{0.9963 \frac{mg}{mL}}{1.0 \frac{mg}{mL}} \times 100 \% = 99.63 \%\right), \left(2. \frac{1.004 \frac{mg}{mL}}{1.0 \frac{mg}{mL}} \times 100 \% = 100.04 \%\right), \left(3. \frac{0.9996 \frac{mg}{mL}}{1.0 \frac{mg}{mL}} \times 100 \% = 99.96 \%\right)$$

$$\left(4. \frac{1.0020 \frac{mg}{mL}}{1.0 \frac{mg}{mL}} \times 100 \% = 100.20 \%\right), \left(5. \frac{1.0069 \frac{mg}{mL}}{1.0 \frac{mg}{mL}} \times 100 \% = 100.69 \%\right), \left(6. \frac{1.0080 \frac{mg}{mL}}{1.0 \frac{mg}{mL}} \times 100 \% = 100.80 \%\right)$$

$$\left(7. \frac{0.9856 \frac{mg}{mL}}{1.0 \frac{mg}{mL}} \times 100 \% = 98.56 \%\right), \left(8. \frac{0.9829 \frac{mg}{mL}}{1.0 \frac{mg}{mL}} \times 100 \% = 98.29 \%\right), \left(9. \frac{0.9793 \frac{mg}{mL}}{1.0 \frac{mg}{mL}} \times 100 \% = 97.93 \%\right)$$

$$\left(10. \frac{0.9902 \frac{mg}{mL}}{1.0 \frac{mg}{mL}} \times 100 \% = 99.02 \%\right), \left(11. \frac{0.9938 \frac{mg}{mL}}{1.0 \frac{mg}{mL}} \times 100 \% = 99.38 \%\right), \left(12. \frac{0.9865 \frac{mg}{mL}}{1.0 \frac{mg}{mL}} \times 100 \% = 98.65 \%\right)$$

$$\left(13. \frac{1.0137 \frac{mg}{mL}}{1.0 \frac{mg}{mL}} \times 100 \% = 101.37 \%\right), \left(14. \frac{1.0099 \frac{mg}{mL}}{1.0 \frac{mg}{mL}} \times 100 \% = 100.99 \%\right), \left(15. \frac{1.0049 \frac{mg}{mL}}{1.0 \frac{mg}{mL}} \times 100 \% = 100.49 \%\right)$$

$$\left(16. \frac{1.0164 \frac{mg}{mL}}{1.0 \frac{mg}{mL}} \times 100\% = 101.64\%\right), \left(17. \frac{1.0141 \frac{mg}{mL}}{1.0 \frac{mg}{mL}} \times 100\% = 101.41\%\right), \left(18. \frac{1.0100 \frac{mg}{mL}}{1.0 \frac{mg}{mL}} \times 100\% = 101.00\%\right)$$

$$\left(19. \frac{0.9821 \frac{mg}{mL}}{1.0 \frac{mg}{mL}} \times 100\% = 98.21\%\right), \left(20. \frac{0.9842 \frac{mg}{mL}}{1.0 \frac{mg}{mL}} \times 100\% = 98.42\%\right), \left(21. \frac{0.9802 \frac{mg}{mL}}{1.0 \frac{mg}{mL}} \times 100\% = 98.02\%\right)$$

Dato	Concentración adicionada (mg/mL)	Concentración recuperada (mg/mL)	% R
1	1.0000	0.9963	99.63
2	1.0000	1.0004	100.04
3	1.0000	0.9996	99.96
4	1.0000	1.0020	100.20
5	1.0000	1.0069	100.69
6	1.0000	1.0080	100.80
7	1.0000	0.9856	98.56
8	1.0000	0.9829	98.29
9	1.0000	0.9793	97.93
10	1.0000	0.9902	99.02
11	1.0000	0.9938	99.38
12	1.0000	0.9865	98.65
13	1.0000	1.0137	101.37
14	1.0000	1.0099	100.99
15	1.0000	1.0049	100.49
16	1.0000	1.0164	101.64
17	1.0000	1.0141	101.41
18	1.0000	1.0100	101.00
19	1.0000	0.9821	98.21
20	1.0000	0.9842	98.42
21	1.0000	0.9802	98.02

3. Cálculo de Σx para los diferentes análisis evaluados.

Σx para R0 = 99.63 % + 100.04 % + 99.96 % = 299.63 %
 Σx para R1 = 100.20 % + 100.69 % + 100.80 = 301.69%
 Σx para R2 = 98.56 % + 98.29 % + 97.93 % = 294.78 %
 Σx para R3 = 99.02 % + 99.38 % + 98.65 % = 297.05 %
 Σx para R4 = 101.37 % + 100.99 % + 100.49% = 302.85 %
 Σx para R5 = 101.64 % + 101.41 % + 101.00 % = 304.05 %
 Σx para R6 = 98.21 % + 98.42 % + 98.02 % = 294.65 %

4. Cálculo del promedio aritmético (\bar{x}) para los diferentes análisis evaluados

$$\bar{x} \text{ para } R0 = 299.63 \% / 3 = 99.88 \% \approx 99.9 \%$$

$$\bar{x} \text{ para } R1 = 301.69 \% / 3 = 100.56 \% \approx 100.6 \%$$

$$\bar{x} \text{ para } R2 = 294.78 \% / 3 = 98.26 \% \approx 98.3 \%$$

$$\bar{x} \text{ para } R3 = 297.05 \% / 3 = 99.02 \% \approx 99.0 \%$$

$$\bar{x} \text{ para } R4 = 302.85 \% / 3 = 100.95 \% \approx 101.0 \%$$

$$\bar{x} \text{ para } R5 = 304.05 \% / 3 = 101.35 \% \approx 101.4 \%$$

$$\bar{x} \text{ para } R6 = 294.65 \% / 3 = 98.22 \% \approx 98.2 \%$$

5. Cálculo de la diferencia absoluta porcentual $|d_i|$.

$$|d_{R1}| = |100.6 \% - 99.9 \%| = 0.7 \%$$

$$|d_{R2}| = |98.3 \% - 99.9 \%| = 1.6 \%$$

$$|d_{R3}| = |99.0 \% - 99.9 \%| = 0.9 \%$$

$$|d_{R4}| = |101.0 \% - 99.9 \%| = 1.1 \%$$

$$|d_{R5}| = |101.4 \% - 99.9 \%| = 1.5 \%$$

$$|d_{R6}| = |98.2 \% - 99.9 \%| = 1.7 \%$$

ROBUSTEZ DEL MÉTODO — FACTOR DE VELOCIDAD DE FLUJO

Réplica	Condición R0	Condición R1	Condición R2
R-1	99.6	100.2	98.6
R-2	100.0	100.7	98.3
R-3	100.0	100.8	97.9
\bar{x}	99.9	100.6	98.3
$ d_i $		0.7	1.6

ROBUSTEZ DEL MÉTODO — FACTOR DE pH

Réplica	Condición R0	Condición R3	Condición R4
R-1	99.6	99.0	101.4
R-2	100.0	99.4	101.0
R-3	100.0	98.7	100.5
\bar{x}	99.9	99.0	101.0
$ d_i $		0.9	1.1

ROBUSTEZ DEL MÉTODO — FACTOR DE TEMPERATURA DE COLUMNA

Réplica	Condición R0	Condición R5	Condición R6
R-1	99.6	101.6	98.2
R-2	100.0	101.4	98.4
R-3	100.0	101.1	98.0
\bar{x}	99.9	101.4	98.2
$ d_i $		1.5	1.7

Criterio de aceptación

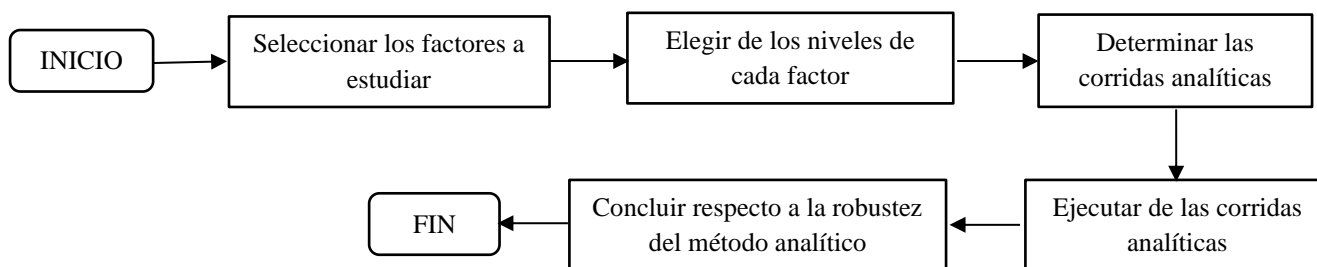
Criterio de aceptación	Resultado	Conclusión
$ di \leq 2.0\%$ con respecto a la condición normal	La $ di $ de la condición R1 es igual a 0.7 con respecto a la condición normal	Cumple
	La $ di $ de la condición R2 es igual a 1.6 con respecto a la condición normal	Cumple
	La $ di $ de la condición R3 es igual a 0.9 con respecto a la condición normal	Cumple
	La $ di $ de la condición R4 es igual a 1.1 con respecto a la condición normal	Cumple
	La $ di $ de la condición R5 es igual a 1.5 con respecto a la condición normal	Cumple
	La $ di $ de la condición R6 es igual a 1.7 con respecto a la condición normal	Cumple

Determinación, análisis y ejemplo práctico de la investigación de cuatro a siete factores

Con el fin de verificar los resultados obtenidos de Robustez por medio de la determinación de la investigación de tres factores como máximo, se evalúa la robustez del método mediante el Diseño de Placket Burman.

Se emplea una misma muestra adicionada de analito preparada a una concentración de 1.0 mg/mL correspondiente al 100 % de la concentración a evaluar, inyectando por triplicado para cada factor analizado: Previo a la inyección de los viales preparados en cada análisis, se verifica que se cumplan los criterios aceptación dados en la Verificación del sistema — Aptitud del sistema ($CV \leq 2.0\%$, $k' > 1.5$, $T < 2.0$, $N \geq 2000$) de una solución de referencia de concentración 1.0 mg/mL. Se reporta el promedio de las muestras inyectadas para $y_1, y_2, y_3, y_4, y_5, y_6, y_7, y_8$.

Diagrama del desarrollo por Diseño de Placket Burman



a. Selección de factores

- I. Seleccionar entre 3 y 5 factores reales para llevar a cabo el estudio de robustez, y mínimo 2 factores falsos (con el fin de poder determinar la media de cuadrados del error (MC_e) y la suma de cuadrados del error (SC_e) para estimar el error experimental).

- II.** Asignar a cada factor real seleccionado cualquiera de las letras A, B, C, D, E, F o G y describirlos en la “Tabla R1”, (estas se asignarán en función del número de factores reales, ejemplo: 3 factores reales corresponden a 3 letras, 4 factores reales corresponden a 4 letras, mientras que para 5 factores reales corresponden a 5 letras). Para asignar los factores a las letras, no es necesario aplicar un procedimiento en específico. Las letras no asignadas se denominan factor falso. ^[9]

Tabla R1. Factores reales y no reales

Letra	Factor
A	Velocidad de flujo
B	Factor falso
C	Temperatura de la columna
D	Proporción de fases
E	Factor falso
F	pH
G	Volumen de inyección

b. Elección de los niveles de cada factor

- I.** Fijar los niveles de cada factor en la “Tabla R2”. El nivel normal es el valor del factor reportado y ejecutado en el método analítico (condiciones normales de operación). La selección de los niveles bajo (-) y alto (+) deben ser fijados bajo el concepto de “*cambios pequeños y deliberados*”. No es necesario incluir aquellas filas asignadas a factores falsos. ^[9]

Tabla R2. Elección de los niveles de cada factor

Letra	Factor	Nivel		
		Bajo (-)	Normal	Alto (+)
A	Velocidad de flujo	0.8	1.0 mL/min	1.2
C	Temperatura de la columna	28	30 °C	32
D	Proporción de fases	40:60	50:50 (ACN:Amortiguador de fosfatos)	60:40
F	pH	5.2	5.4	5.6
G	Volumen de inyección	18	20 µL	22

c. Determinación de las corridas analíticas

- I.** Determinar las corridas analíticas auxiliándose de la “Tabla R3”, y describir las condiciones de las corridas analíticas considerando los niveles de cada factor, según aplique. ^[7]

Tabla R3. Matriz de tratamientos

Corrida analítica	Nivel del factor						
	A	B	C	D	E	F	G
1	+	-	-	+	-	+	+
2	+	+	-	-	+	-	+
3	+	+	+	-	-	+	-
4	-	+	+	+	-	-	+
5	+	-	+	+	+	-	-
6	-	+	-	+	+	+	-
7	-	-	+	-	+	+	+
8	-	-	-	-	-	-	-

Condiciones de las corridas analíticas.

Corrida 1: 1.2 mL/min de velocidad de flujo, 28 °C para la temperatura de la columna, 60:40 (ACN: Amortiguador de fosfatos) de proporción de fases, 5.6 de pH y 22 µL de volumen de inyección.

Corrida 2: 1.2 mL/min de velocidad de flujo, 32 °C para la temperatura de la columna, 40:60 (ACN: Amortiguador de fosfatos) de proporción de fases, 5.2 de pH y 22 µL de volumen de inyección.

Corrida 3: 1.2 mL/min de velocidad de flujo, 32 °C para la temperatura de la columna, 40:60 (ACN: Amortiguador de fosfatos) de proporción de fases, 5.6 de pH y 18 µL de volumen de inyección.

Corrida 4: 0.8 mL/min de velocidad de flujo, 32 °C para la temperatura de la columna, 60:40 (ACN: Amortiguador de fosfatos) de proporción de fases, 5.2 de pH y 22 µL de volumen de inyección.

Corrida 5: 1.2 mL/min de velocidad de flujo, 28 °C para la temperatura de la columna, 60:40 (ACN: Amortiguador de fosfatos) de proporción de fases, 5.2 de pH y 18 µL de volumen de inyección.

Corrida 6: 0.8 mL/min de velocidad de flujo, 32 °C para la temperatura de la columna, 60:40 (ACN: Amortiguador de fosfatos) de proporción de fases, 5.6 de pH y 18 µL de volumen de inyección.

Corrida 7: 0.8 mL/min de velocidad de flujo, 28 °C para la temperatura de la columna, 40:60 (ACN: Amortiguador de fosfatos) de proporción de fases, 5.6 de pH y 22 µL de volumen de inyección.

Corrida 8: 0.8 mL/min de velocidad de flujo, 28 °C para la temperatura de la columna, 40:60 (ACN: Amortiguador de fosfatos) de proporción de fases, 5.2 de pH y 18 µL de volumen de inyección.

- II. Desglosar la descripción de las corridas analíticas en la “Tabla R4”. En caso de ser un factor falso colocar los datos (+ o -) de la letra asignada conforme lo indica la “Tabla R3”.^[9]

Tabla R4. Corridas analíticas

Corrida analítica	Nivel del factor						
	A	B	C	D	E	F	G
	Velocidad de flujo	Factor falso	Temperatura de la columna (°C)	Proporción de fases	Factor falso	pH	Volumen de inyección (µL)
1	1.2	-	28	60:40	-	5.6	22
2	1.2	+	28	40:60	+	5.2	22
3	1.2	+	32	40:60	-	5.6	20
4	0.8	+	32	60:40	-	5.2	22
5	1.2	-	32	60:40	+	5.2	20
6	0.8	+	28	60:40	+	5.6	20
7	0.8	-	32	40:60	+	5.6	22
8	0.8	-	28	40:60	-	5.2	20

d. Ejecución de las corridas analíticas para generar resultados

- I. Analizar una misma muestra analítica homogénea indicada en el método a un nivel de concentración del 100% por lo menos por triplicado para cada condición de corrida analítica (8), debe ser realizado por un mismo analista. Se debe llevar a cabo la verificación del sistema para condición de corrida analítica (8), dicha verificación del sistema debe cumplir con los criterios de aceptación establecidos previo al análisis de cada corrida analítica. Tanto la verificación del sistema como su subsecuente corrida analítica por triplicado debe ser independiente del resto, manteniendo constantes todas las otras condiciones establecidas en el método (materiales, equipos, reactivos, soluciones, entre otras según aplique).
- II. Reportar la respuesta analítica por medio del porcentaje de recobro (% R) o respuesta analítica.
- III. Calcular el promedio aritmético (\bar{x}), la desviación estándar (s) y el coeficiente de variación (CV) de los resultados obtenidos de cada una de las corridas analíticas.
- IV. Desglosar el promedio aritmético (\bar{x}) en la “Tabla R5” como resultado de cada corrida analítica ($y_1, y_2, y_3, y_4, y_5, y_6, y_7, y_8$).^[9]

Tabla R5. Resultados del estudio de robustez del método analítico

Corrida analítica	Nivel del factor							y
	A	B	C	D	E	F	G	
	Velocidad de flujo	Factor falso	Temperatura de la columna (°C)	Proporción de fases	Factor falso	pH	Volumen de inyección (µL)	
1	1.2	-	28	60:40	-	5.6	22	411439
2	1.2	+	28	40:60	+	5.2	22	383779
3	1.2	+	32	40:60	-	5.6	20	359577
4	0.8	+	32	60:40	-	5.2	22	442556
5	1.2	-	32	60:40	+	5.2	20	428726
6	0.8	+	28	60:40	+	5.6	20	376864
7	0.8	-	32	40:60	+	5.6	22	366492
8	0.8	-	28	40:60	-	5.2	20	325002

e. Análisis de los resultados de la investigación de cuatro a siete factores.

- I. Calcular los contrastes de cada factor, sea real o falso ($C_A, C_B, C_C, C_D, C_E, C_F, C_G$), aplicando las siguientes fórmulas: [9]

$$C_A = (y_1 + y_2 + y_3 + y_5) - (y_4 + y_6 + y_7 + y_8)$$

$$C_B = (y_2 + y_3 + y_4 + y_6) - (y_1 + y_5 + y_7 + y_8)$$

$$C_C = (y_3 + y_4 + y_5 + y_7) - (y_1 + y_2 + y_6 + y_8)$$

$$C_D = (y_1 + y_4 + y_5 + y_6) - (y_2 + y_3 + y_7 + y_8)$$

$$C_E = (y_2 + y_5 + y_6 + y_7) - (y_1 + y_3 + y_4 + y_8)$$

$$C_F = (y_1 + y_3 + y_6 + y_7) - (y_2 + y_4 + y_5 + y_8)$$

$$C_G = (y_1 + y_2 + y_4 + y_7) - (y_3 + y_5 + y_6 + y_8)$$

I.A — Cálculo de los contrastes de cada factor

$$C_A = (411439 + 383779 + 359577 + 428726) - (442556 + 376864 + 366492 + 325002) = 72607$$

$$C_B = (383779 + 359577 + 442556 + 376864) - (411439 + 428726 + 366492 + 325002) = 31117$$

$$C_C = (359577 + 442556 + 428726 + 366492) - (411439 + 383779 + 376864 + 325002) = 100267$$

$$C_D = (411439 + 442556 + 428726 + 376864) - (383779 + 359577 + 366492 + 325002) = 224735$$

$$C_E = (383779 + 428726 + 376864 + 366492) - (411439 + 359577 + 442556 + 325002) = 17287$$

$$C_F = (411439 + 359577 + 376864 + 366492) - (383779 + 442556 + 428726 + 325002) = -65691$$

$$C_G = (411439 + 383779 + 442556 + 366492) - (359577 + 428726 + 376864 + 325002) = 114097$$

- II.** Calcular la suma de cuadrados de cada factor real conforme a la letra que le haya sido asignada (SC_{CA} , SC_{CB} , SC_{CC} , SC_{CD} , SC_{CE} , SC_{CF} , SC_{CG}) aplicando la siguiente fórmula: ^[9]

$$SC_i = \sum \frac{C_i^2}{8}$$

Donde:

SC_i = Suma de cuadrados de cada uno de los factores.

C_i = Cada uno de los factores.

II.A — Cálculo de los contrastes de cada factor real

$$SC_{CA} = \frac{72607^2}{8} = 658972056.1$$

$$SC_{CC} = \frac{100267^2}{8} = 1256683911$$

$$SC_{CD} = \frac{224735^2}{8} = 6313227528$$

$$SC_{CF} = \frac{-65691^2}{8} = 539413435.13$$

$$SC_{CG} = \frac{114097^2}{8} = 1627265676$$

- III.** Calcular la suma de los cuadrados del error (SC_e) y la media de cuadrados del error (MC_e). La suma de cuadrados del error se calcula al sumar la suma de cuadrados de todos los factores falsos. La suma de cuadrado del error se calcula aplicando la siguiente fórmula: ^[9]

$$SC_e = \sum \frac{C_i^2}{8}$$

Donde:

SC_e = Suma de cuadrados del error.

i = Cada factor falso.

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

$$MC_e = \sum \frac{SC_e}{f}$$

Donde:

MC_e = Media de cuadrados del error.

SC_e = Suma de cuadrados del error.

f = Número de factores falsos.

III.A — Cálculo de la suma de los cuadrados del error (SC_e) y la media de cuadrados del error (MC_e).

$$SC_e = \frac{31117^2}{8} + \frac{17287^2}{8} = 158388507.3$$

$$MC_e = \frac{158388507.3}{2} = 79194253.63$$

IV. Calcular la F_{cal} de cada factor real conforme a la letra que le haya sido asignada, aplicando la siguiente fórmula:^[9]

$$F_{cal} = \frac{MC_{Ci}}{MC_e}$$

Donde:

F_{cal} = Valor de F calculado de la distribución de Fisher.

MC_{Ci} = Media de cuadrados de cada uno de los factores. En este caso $SC_{Ci} = MC_{Ci}$, dado que a cada uno de los factores le corresponde un solo grado de libertad.

MC_e = Media de cuadrados del error.

IV.A — Cálculo de la F_{cal} para cada factor.

$$F_{cal A} = \frac{658972056.1}{79194253.63} = 8.321$$

$$F_{cal C} = \frac{1256683911}{79194253.63} = 15.868$$

$$F_{cal D} = \frac{6313227528}{79194253.63} = 79.718$$

$$F_{cal F} = \frac{539413435.13}{79194253.63} = 6.811$$

$$F_{cal G} = \frac{1627265676}{79194253.63} = 20.548$$

V. Describir los resultados en la “Tabla R6”.^[9]

Tabla R6. Resultado de los cálculos de la F_{cal} para cada factor

Letra	Factor	F_{cal}
A	Velocidad de flujo	8.321
C	Temperatura de la columna	15.868
D	Proporción de fases	79.718
F	pH	6.811
G	Volumen de inyección	20.548

- VI.** Anotar el valor de $F_{(1, gl_e)}$ y realizar la toma de decisión respecto al efecto de cada factor en la “Tabla R7”.^[9]

Tabla R7. Toma de decisión respecto al efecto de cada factor

Factor	F_{cal}	F_(1, gl_e)	Decisión
Velocidad de flujo	8.321	18.513	No se presenta efecto del factor
Temperatura de la columna	15.868	18.513	No se presenta efecto del factor
Proporción de fases	79.718	18.513	Se presenta efecto del factor
pH	6.811	18.513	No se presenta efecto del factor
Volumen de inyección	20.548	18.513	Se presenta efecto del factor

El método se considera robusto respecto al factor investigado, si la toma de decisión indica que éste no presenta efecto; por lo que el método proporcionara resultados estadísticamente equivalentes. Si se presenta efecto del factor, el método analítico no es robusto a dicho factor y, por lo tanto, es importante informar que el nivel normal de operación o ejecución para este factor no puede ser modificado, ya que el método proporcionara resultados incorrectos.

f. Conclusión respecto de la robustez del método analítico.

- I. Realizar la conclusión respecto de la robustez del método analítico conforme al análisis de resultados a los factores investigados y describirla en la “Tabla R8”.^[9]

Tabla R8. Conclusión respecto a la robustez del método analítico

Factor	Conclusión
Velocidad de flujo	El método analítico es robusto en el intervalo 1.0 mL/min ± 0.2.
Temperatura de la columna	El método analítico es robusto en el intervalo 30 °C ± 2
Proporción de fases	El método analítico no es robusto, por lo tanto, la proporción de fases siempre debe ser 50:50 (ACN:Buffer fosfatos) µL.
pH	El método analítico es robusto en el intervalo de 5.4 ± 0.2.
Volumen de inyección	El método analítico no es robusto, por lo tanto, el volumen de inyección debe ser de 20 µL.

Criterio de aceptación de la investigación de cuatro a siete factores

La toma de decisión respecto al efecto de cada factor se basa en la siguiente regla:

- Si $F_{cal} \geq F_{tab(1, gl_e)}$ no se presenta efecto del factor.
- Si $F_{cal} < F_{tab(1, gl_e)}$ no se presenta efecto del factor.^[9]

Estabilidad de la muestra analítica

De acuerdo con el apéndice V. Principios generales de buenas prácticas de laboratorio de la FEUM 13va edición, indica que para todos los ensayos es necesario conocer la estabilidad de los elementos de prueba y de referencia en las condiciones de almacenamiento y de prueba. [9]

Debido a que el proceso de validación de los métodos analíticos puede comprender, pero no está limitado al estudio de las características de desempeño mencionadas en la “Tabla 1”, a continuación, se describe una propuesta de cómo llevar a cabo la determinación, el análisis de datos, y la evaluación por medio de un criterio de aceptación.

Se recomienda que esta característica de desempeño analítico se realice como una de las pruebas iniciales del primer día de validación, posteriores a la verificación del sistema (Aptitud del sistema).

Determinación de la estabilidad analítica.

- I. Determinar las condiciones de temperatura y tiempo, en las que la solución de referencia o de muestra analítica (placebo adicionado, muestra adicionada de analito o muestras representativas del 100% del analito) permanezcan estables.
- II. Almacenar las soluciones analizadas bajo las condiciones que se establezcan en el protocolo de validación aprobado, por ejemplo: temperatura ambiente, refrigeración y en Automuestreador en el caso de CLAR.
- III. Analizar las soluciones a diferentes tiempos a partir del tiempo cero hasta completar el periodo de duración de los días de validación, o hasta demostrar qué tiempo las soluciones son estables. [3, 14]

Análisis de datos de la estabilidad analítica.

- I. Reportar la respuesta analítica por medio del porcentaje de recobro ($\% R$), a través de los resultados de verificación del sistema realizados en el día de validación, según aplique a los diferentes tiempos evaluados.
- II. Calcular el valor del promedio aritmético (\bar{x}) del porcentaje de recobro ($\% R$) de los diferentes tiempos evaluados.
- III. Evaluar la diferencia absoluta porcentual de la media aritmética ($|d_i|$), respecto a los diferentes tiempos evaluados. [3, 14]

Criterio de aceptación de la estabilidad analítica

- $|d_i| \leq 2.0 \%$ de cada tiempo respecto al análisis inicial para métodos cromatográficos. [3]

Ejemplo de estabilidad analítica

Se determina la estabilidad analítica de la solución muestra adicionada de analito a una concentración 1.0 mg/mL, en temperatura ambiente controlada (20 a 25 °C), las muestras preparadas se evalúan en los intervalos de tiempo 0 (inicial), 3, 6, 12 y 24 horas.

ESTABILIDAD ANALÍTICA DE LA MUESTRA

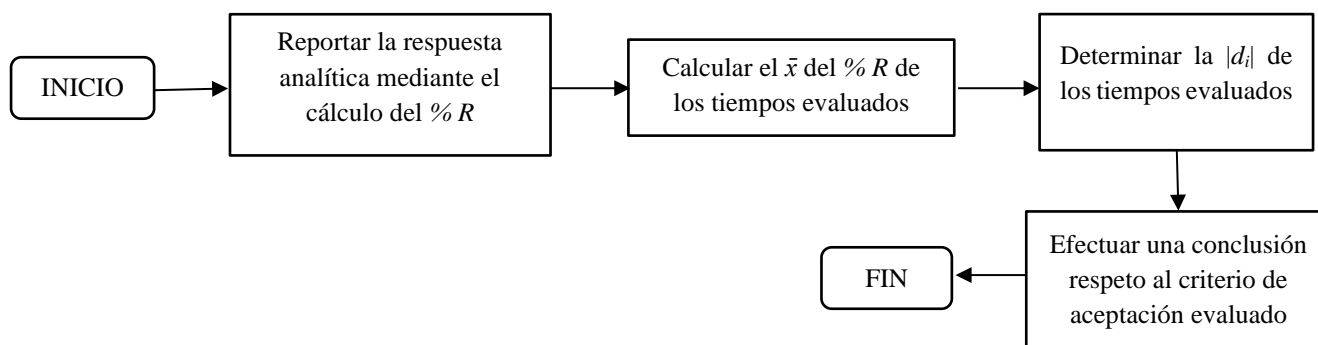
Dato	Nombre de la muestra	Área (AU)
1	Muestra adicionada 0 horas (inicial)	345432
2	Muestra adicionada 0 horas (inicial)	344953
3	Muestra adicionada 0 horas (inicial)	345715
4	Muestra adicionada 6 horas	346626
5	Muestra adicionada 6 horas	345987
6	Muestra adicionada 6 horas	346257
7	Muestra adicionada 12 horas	348726
8	Muestra adicionada 12 horas	347629
9	Muestra adicionada 12 horas	348983
10	Muestra adicionada 24 horas	351839
11	Muestra adicionada 24 horas	351745
12	Muestra adicionada 24 horas	352083

Cálculos

Fórmulas empleadas

- Concentración recuperada [C_{RE}] y porcentaje de recobro (% R).
- Promedio aritmético (\bar{x}) y diferencia absoluta porcentual estándar $|d_i|$

Diagrama de procesamiento de datos



Desarrollo de cálculos

1. Cálculo de concentración recuperada [C_{RE}].

$$\left(1. \frac{345432 \times 1.0 \frac{mg}{mL}}{345747} = 0.9991 \frac{mg}{mL} \right), \left(2. \frac{344953 \times 1.0 \frac{mg}{mL}}{345747} = 0.9977 \frac{mg}{mL} \right), \left(3. \frac{345715 \times 1.0 \frac{mg}{mL}}{345747} = 0.9999 \frac{mg}{mL} \right)$$

$$\left(4. \frac{346626 \times 1.0 \frac{mg}{mL}}{345747} = 1.0025 \frac{mg}{mL} \right), \left(5. \frac{345987 \times 1.0 \frac{mg}{mL}}{345747} = 1.0007 \frac{mg}{mL} \right), \left(6. \frac{346257 \times 1.0 \frac{mg}{mL}}{345747} = 1.0015 \frac{mg}{mL} \right)$$

$$\left(7. \frac{348726 \times 1.0 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}}{345747} = 1.0086 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}\right), \left(8. \frac{347629 \times 1.0 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}}{345747} = 1.0054 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}\right), \left(9. \frac{348983 \times 1.0 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}}{345747} = 1.0094 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}\right)$$

$$\left(10. \frac{351839 \times 1.0 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}}{345607} = 1.0180 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}\right), \left(11. \frac{351745 \times 1.0 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}}{345607} = 1.0178 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}\right), \left(12. \frac{352083 \times 1.0 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}}{345607} = 1.0187 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}\right)$$

2. Cálculo del porcentaje de recobro (% R).

$$\left(1. \frac{0.9991 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}}{1.0 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}} \times 100 \% = 99.91 \%\right), \left(2. \frac{0.9977 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}}{1.0 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}} \times 100 \% = 99.77 \%\right), \left(12. \frac{0.9999 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}}{1.0 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}} \times 100 \% = 99.99 \%\right)$$

$$\left(4. \frac{1.0025 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}}{1.0 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}} \times 100 \% = 100.25 \%\right), \left(5. \frac{1.0007 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}}{1.0 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}} \times 100 \% = 100.07 \%\right), \left(6. \frac{1.0015 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}}{1.0 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}} \times 100 \% = 100.15 \%\right)$$

$$\left(7. \frac{1.0086 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}}{1.0 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}} \times 100 \% = 100.86 \%\right), \left(8. \frac{1.0054 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}}{1.0 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}} \times 100 \% = 100.54 \%\right), \left(9. \frac{1.0094 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}}{1.0 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}} \times 100 \% = 100.94 \%\right)$$

$$\left(10. \frac{1.0180 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}}{1.0 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}} \times 100 \% = 101.80 \%\right), \left(11. \frac{1.0178 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}}{1.0 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}} \times 100 \% = 101.78 \%\right), \left(12. \frac{1.0187 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}}{1.0 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}} \times 100 \% = 101.87 \%\right)$$

Dato	Concentración adicionada (mg/mL)	Concentración recuperada (mg/mL)	% R
1	1.00	0.9991	99.91
2	1.00	0.9977	99.77
3	1.00	0.9999	99.99
4	1.00	1.0025	100.25
5	1.00	1.0007	100.07
6	1.00	1.0015	100.15
7	1.00	1.0086	100.86
8	1.00	1.0054	100.54
9	1.00	1.0094	100.94
10	1.00	1.0180	101.80
11	1.00	1.0178	101.78
12	1.00	1.0187	101.87

3. Cálculo de Σx para los diferentes tiempos evaluados.

Σx del tiempo 0 hrs = 99.91 % + 99.77 % + 99.99 % = 299.67 %

Σx del tiempo 6 hrs = 100.25 % + 100.07 % + 100.15 = 300.47%

Σx del tiempo 12 hrs = 100.86 % + 100.54 % + 100.94 % = 302.34 %

Σx del tiempo 24 hrs = 101.80 % + 101.78 % + 101.87 % = 305.45 %

4. Cálculo del promedio aritmético (\bar{x}) para los diferentes tiempos evaluados

\bar{x} del tiempo 0 hrs = $299.67 \% / 3 = 99.89 \% \approx 99.9 \%$

\bar{x} del tiempo 6 hrs = $300.47 \% / 3 = 100.16 \% \approx 100.2 \%$

\bar{x} del tiempo 12 hrs = $302.34 \% / 3 = 100.78 \% \approx 100.8 \%$

\bar{x} del tiempo 24 hrs = $305.45 \% / 3 = 101.86 \% \approx 101.8 \%$

5. Cálculo de la diferencia absoluta porcentual $|d_i|$.

$|d_1| = |100.2 \% - 99.9 \%| = 0.3 \%$

$|d_2| = |100.8 \% - 99.9 \%| = 0.9 \%$

$|d_3| = |101.8 \% - 99.9 \%| = 1.9 \%$

ESTABILIDAD ANALÍTICA

Muestra	0 horas (Inicial)	6 horas	12 horas	24 horas
M-1	99.9	100.3	100.9	101.8
M-2	99.8	100.1	100.5	101.8
M-3	100.0	100.2	100.9	101.9
\bar{x}	99.9	100.2	100.8	101.8
	$ d_i $	0.3	0.9	1.9

Criterio de aceptación

Criterio de aceptación	Resultado	Conclusión
$ d_i \leq 2.0 \%$ de cada tiempo respecto al análisis inicial	$ d_1 = 0.3 \%$ para 6 horas	Cumple
	$ d_2 = 0.9 \%$ para 12 horas	Cumple
	$ d_3 = 1.9 \%$ para 24 horas	Cumple

Límite de detección y cuantificación del método

De acuerdo con lo indicado en el apartado de “*Lineamientos generales de las características de desempeño analítico*” del presente manual, el límite de detección del método y el límite de cuantificación del método son características de desempeño analítico que deben determinarse cuando un método analítico se aplica como prueba límite y en los métodos cuantitativos categoría II, respectivamente. ^[9] No obstante, con la finalidad de abordar las presentes características de desempeño analítico, se describe cómo llevar a cabo la determinación el análisis de datos y la evaluación por medio de criterios de aceptación.

Determinación para métodos instrumentales basado en la señal ruido

- I. Medir la respuesta analítica de por lo menos 5 blancos o matrices no adicionadas de analito.
- II. Evaluar las respuestas analíticas de muestras de concentraciones conocidas del analito que incluya los límites de especificación de la aplicación analítica del método. ^[9]
- III. El ruido a corto plazo influye en la precisión de la cuantificación, por ello es requerido estimar la relación señal-ruido en los resultados de un análisis, esta se calcula utilizando la siguiente ecuación:

$$S/N = \frac{2H}{h}$$

Donde:

S/N = Señal ruido.

H = Altura del pico correspondiente al componente en cuestión, en el cromatograma obtenido con la solución de referencia prescrita, medida desde el máximo del pico hasta la línea de base extrapolada de la señal observada sobre cromatograma una distancia igual a por lo menos 5 veces el ancho de la mitad de la altura.

h = Rango del ruido en un cromatograma obtenido después de la inyección o aplicación de un blanco, observado en una distancia igual a por lo menos 5 veces el ancho a la mitad de la altura del pico en el cromatograma obtenido con la solución de referencia prescrita y, si es posible, situado igualmente alrededor del lugar donde se encontraría este pico. ^[8]

Análisis de datos para métodos instrumentales basado en la señal ruido

- I. Evaluar las respuestas analíticas de muestras de concentraciones conocidas del analito que incluya los límites de especificación de la aplicación analítica del método.
- II. Determinar aquella concentración del analito que genere una relación señal/ruido de por lo menos de 3 a 1 para el límite de detección.
- III. Determinar aquella cantidad del analito que genere una relación señal/ruido de por lo menos de 10 a 1 para el límite de detección. ^[3, 9, 16]

Criterio de aceptación para métodos instrumentales basado en la señal ruido

- Para el LD la relación señal/ruido debe ser la inmediatamente superior a 3.
- Para el LC la relación señal/ruido debe ser inmediatamente superior a 10. [9, 16]

Ejemplo de límite de detección y cuantificación basado en la señal ruido.

De manera informativa se decide evaluar el LD y LC para demostrar que, bajo las condiciones analíticas del método a validar, dichos parámetros puedan ser estimados con la finalidad de plantear una nueva validación para la cuantificación de una impureza presente en el analito “A” al 0.1 % respecto al 100 % de la concentración a evaluar.

Para determinarlos por medio de la relación señal—ruido (S/N), se prepara una solución estándar a una concentración de 0.001 mg/mL (0.1 % en relación del 100% del analito evaluado) o lo que es equivalente a 1.0 µg/mL, los resultados de altura del pico (*H*) son:

APTITUD DEL SISTEMA —LD y LC basado en S/N		
Inyección	Nombre de la muestra	Altura (mV)
1	Solución de referencia al 0.1 %	1.7831
2	Solución de referencia al 0.1 %	1.8454
3	Solución de referencia al 0.1 %	1.8978
4	Solución de referencia al 0.1 %	1.8732
5	Solución de referencia al 0.1 %	1.8551
6	Solución de referencia al 0.1 %	1.8668

De igual manera se inyectan 5 soluciones de placebo no adicionado de analito, los resultados de rango del ruido (*h*) son:

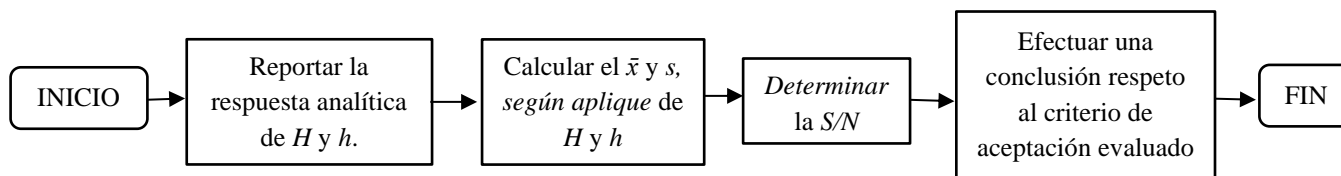
Respuesta analítica de placebos no adicionados de analito — LD y LC basado en S/N	
Inyección	Desviación del detector (mV)
1	0.1044
2	0.1049
3	0.1041
4	0.1046
5	0.1048

Cálculos

Fórmulas empleadas

- Promedio aritmético (\bar{x}) y desviación estándar (*s*).
- Límite de detección y cuantificación por la relación señal-ruido (S/N).

Diagrama de procesamiento de datos



Desarrollo de cálculos

Determinación del LD y LC basado en la relación señal-ruido

1. Cálculo de Σx y promedio aritmético (\bar{x}) de Altura (mV) [H] y Desviación del detector (mV) [h].

$$\Sigma \bar{x} \text{ de } H = 1.7831 + 1.8454 + 1.8978 + 1.8732 + 1.8551 + 1.8668 = 11.1214$$

$$n \text{ de } H = 6$$

$$\bar{x} \text{ de } H = 11.1214/6 = 1.8536$$

$$\Sigma \bar{x} \text{ de } h = 0.1044 + 0.1049 + 0.1041 + 0.1046 + 0.1048 = 0.5228$$

$$n \text{ de } h = 5$$

$$\bar{x} \text{ de } h = 0.5228/5 = 0.1046$$

2. Cálculo de la relación señal-ruido (S/N).

$$S/N = \frac{2 \times 1.8536}{0.1046} = 35.4417$$

Criterio de aceptación

Criterio de aceptación	Resultado de relación señal-ruido	Conclusión
S/N menor a 3 para el LD	35.4417	La relación señal-ruido es mayor a 3 para el LD y mayor a 10 para el LC
S/N menor a 10 para el LD	35.4417	

Determinación para métodos instrumentales basado en linealidad

- I. Generar una relación concentración vs respuesta analítica con al menos 3 niveles de concentración por triplicado en un intervalo de 50 a 120 % de la especificación para la cuantificación de una impureza. [7, 14]
- II. De acuerdo con USP edición 41, el LD y LC debería validarse posteriormente mediante el análisis de un número adecuado de muestras preparadas al límite de detección o que se sabe que están cerca de dicho límite. [14] Se recomienda evaluar conforme a lo indicado en Exactitud del método.

Análisis de datos para métodos instrumentales basado en linealidad

- I. Reportar la relación de concentración (x) vs respuesta analítica (y).

- II. Ajustar los datos a un modelo de regresión lineal por medio del cálculo coeficiente de determinación (r^2) pendiente (b), el intervalo de confianza para la pendiente $IC(\beta 1)$, así como una medida de error de la respuesta analítica (s_e); ya sea debido a la desviación estándar de regresión ($s_{y/x}$); la desviación estándar de la ordenada al origen (s_a); la desviación estándar de la respuesta analítica de blancos o matrices analíticas no adicionadas de analito (s_w). En caso de usar la medida de error de la respuesta analítica (s_w), preparar por lo menos 5 blancos o matrices analíticas según proceda y medir la respuesta analítica. [7, 14]
- III. Estimar el límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC).

Criterios de aceptación para métodos instrumentales basado en linealidad

Determinación de métodos no instrumentales e instrumentales basados en linealidad

- $r^2 = \geq 0.98$. [8]
- $IC(\beta 1)$ no debe incluir el cero. [4, 8, 14]
- El LD debe ser menor a la especificación de la prueba de impurezas límite. [7, 8, 14]
- El LC debe ser menor a la especificación de valoración de la prueba de impurezas. [7, 8, 14]

Ejemplo práctico del límite de detección y cuantificación basado en linealidad

De manera informativa se decide evaluar el LD y LC para demostrar que, bajo las condiciones analíticas del método a validar, dichos parámetros puedan ser estimados con la finalidad de plantear una nueva validación para la cuantificación de una impureza presente en el analito “A” al 0.1 % respecto al 100 % de la concentración a evaluar.

Para determinar por medio de linealidad, se prepara una solución estándar a una concentración de 0.001 mg/mL (0.1 % en relación del 100% del analito evaluado) o lo que es equivalente a 1.0 $\mu\text{g/mL}$, se plantea el siguiente criterio de aceptación: $CV \leq 2.0 \%$, los resultados son:

APTITUD DEL SISTEMA —LD y LC basado en linealidad		
Inyección	Nombre de la muestra	Área (AU)
1	Solución de referencia al 0.1 %	3442
2	Solución de referencia al 0.1 %	3471
3	Solución de referencia al 0.1 %	3481
4	Solución de referencia al 0.1 %	3523
5	Solución de referencia al 0.1 %	3489
6	Solución de referencia al 0.1 %	3511

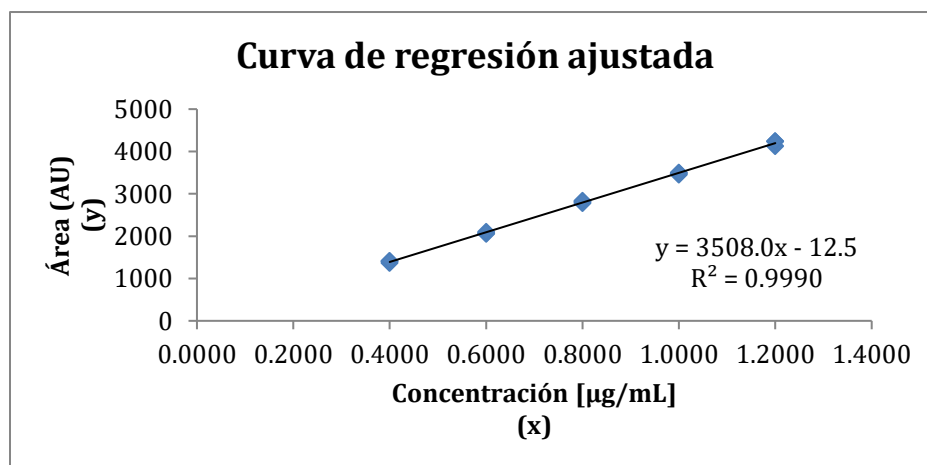
De igual manera se inyectan 5 soluciones de placebo no adicionado de analito y se preparan por triplicado una solución de referencia a una concentración de 2.0 mg/mL a partir de pesadas independientes. De cada solución de referencia preparada se toma una serie alícuotas para preparar una curva de calibración (CC) con soluciones al 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 y 1.2 $\mu\text{g/mL}$ correspondientes al 40, 60, 80, 100 y 120% respectivamente a la concentración del analito a evaluar (0.1 %), los resultados son:

**Respuesta analítica de placebos
no adicionados de analito — LD y LC basado en linealidad**

Inyección	Área (AU)
1	58
2	16
3	10
4	72
5	17

Curva de calibración de LD y LC basado en linealidad

Inyección	Nombre de la muestra	Concentración (µg/mL) (x)	Área (AU) (y)
1	Solución referencia 40% - CC 1	0.4000	1407
2	Solución referencia 40% - CC 2	0.4000	1372
3	Solución referencia 40% - CC 3	0.4000	1414
4	Solución referencia 60% - CC 1	0.6000	2054
5	Solución referencia 60% - CC 2	0.6000	2069
6	Solución referencia 60% - CC 3	0.6000	2104
7	Solución referencia 80% - CC 1	0.8000	2814
8	Solución referencia 80% - CC 2	0.8000	2786
9	Solución referencia 80% - CC 3	0.8000	2833
10	Solución referencia 100% - CC 1	1.0000	3503
11	Solución referencia 100% - CC 2	1.0000	3459
12	Solución referencia 100% - CC 3	1.0000	3487
13	Solución referencia 120% - CC 1	1.2000	4239
14	Solución referencia 120% - CC 2	1.2000	4129
15	Solución referencia 120% - CC 3	1.2000	4238

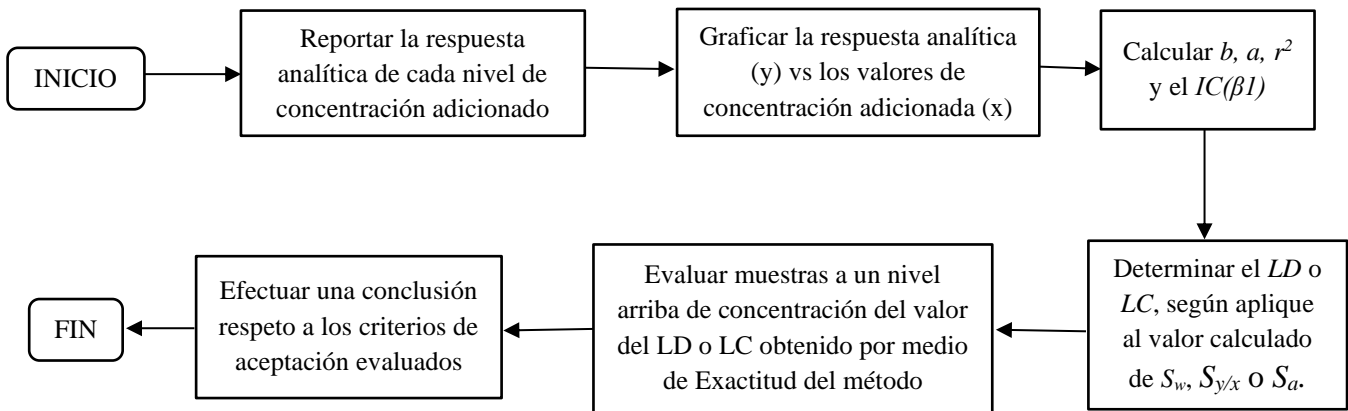


Cálculos

Fórmulas empleadas

- Pendiente (b), ordenada al origen (a) y coeficiente de determinación (r^2).
- Intervalo de confianza para la pendiente $IC(\beta_1)$, desviación estándar de la regresión ($s_{y/x}$) y desviación estándar de la pendiente (sb_1).
- Intervalo de confianza para la ordenada al origen $IC(\beta_0)$, desviación estándar de la ordenada al origen (S_a).
- Promedio aritmético (\bar{x}) y desviación estándar de la respuesta analítica de placebos no adicionados de analito (S_w)

Diagrama de procesamiento de datos



Determinación del LD y LC basado en linealidad

1. Cálculo de Σx , Σy , Σxy , Σx^2 , Σy^2 y \bar{x} .

$$\Sigma x = 0.4 + 0.4 + 0.4 + 0.6 + 0.6 + 0.6 + 0.8 + 0.8 + 0.8 + 1.0 + 1.0 + 1.0 + 1.2 + 1.2 + 1.2 = 12.0$$

$$\Sigma y = 1407 + 1372 + 1414 + 2054 + 2069 + 2104 + 2814 + 2786 + 2833 + 3503 + 3459 + 3487 + 4239 + 4129 + 4238 = 41908$$

$$\Sigma xy = (0.4 \times 1407) + (0.4 \times 1372) + (0.4 \times 1414) + (0.6 \times 2054) + (0.6 \times 2069) + (0.6 \times 2104) + (0.8 \times 2814) + (0.8 \times 2786) + (0.8 \times 2833) + (1.0 \times 3503) + (1.0 \times 3459) + (1.0 \times 3487) + (1.2 \times 4239) + (1.2 \times 4129) + (1.2 \times 4238) = 37736$$

$$\Sigma x^2 = 0.4^2 + 0.4^2 + 0.4^2 + 0.6^2 + 0.6^2 + 0.6^2 + 0.8^2 + 0.8^2 + 0.8^2 + 1.0^2 + 1.0^2 + 1.0^2 + 1.2^2 + 1.2^2 + 1.2^2 = 10.8$$

$$\Sigma y^2 = 1407^2 + 1372^2 + 1414^2 + 2054^2 + 2069^2 + 2104^2 + 2814^2 + 2786^2 + 2833^2 + 3503^2 + 3459^2 + 3487^2 + 4239^2 + 4129^2 + 4238^2 = 131867468$$

$$n = 15$$

$$\bar{x} = 12/15 = 0.8$$

2. Cálculo de la pendiente (b), ordenada al origen (a) y coeficiente de determinación (r^2).

$$b = \frac{(15 \times 37736) - (12.0 \times 41908)}{(15 \times 10.8) - (12.0)^2} = 3508.0$$

$$a = \frac{41908 - (3508.0 \times 12.0)}{15} = -12.5$$

$$r^2 = \frac{[(15 \times 37736) - (12.0 \times 41908)]^2}{[(15 \times 10.8) - (12.0)^2] \times [(15 \times 131867468) - (41908)^2]} = 0.9990$$

3. Cálculo de la desviación estándar de la regresión ($S_{y/x}$), desviación estándar de la pendiente (sb_1) para el intervalo de confianza para la pendiente $IC(\beta_1)$.

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{131867468 - (3508.0 \times 37736) - (-12.5 \times 41908)}{15 - 2}} = 32.14$$

$$sb_1 = 32.14 \sqrt{\frac{1}{10.8 - \frac{(12.0)^2}{15}}} = 29.34$$

$$IC(\beta_1) = 3508.0 - 2.160 \times 29.34 = 3444.6$$

$$IC(\beta_1) = 3508.0 + 2.160 \times 29.34 = 3571.4$$

INTERVALO DE CONFIANZA PARA LA PENDIENTE

IC(β_1)	3444.6	3571.4
-----------------	--------	--------

4. Cálculo de la desviación estándar de la ordenada al origen (S_a)

$$S_a = 32.14 \times \sqrt{\frac{1}{15} + \frac{(0.8)^2}{10.8 - \frac{12.0^2}{15}}} = 24.90$$

5. Cálculo de Σx , promedio aritmético (\bar{x}) y desviación estándar (s) del área de placebos no adicionados de analito (S_w)

$$\Sigma \bar{x} \text{ del área} = 58 + 16 + 10 + 72 + 17 = 173$$

$$n = 5$$

$$\bar{x} \text{ del área} = 173/5 = 34.60$$

$$\Sigma(x - \bar{x})^2 = (58 - 34.6)^2 + (16 - 34.6)^2 + (10 - 34.6)^2 + (72 - 34.6)^2 + (17 - 34.6)^2 = 3207.20$$

$$s = \sqrt{\frac{3207.20}{5 - 1}} = 28.3161$$

6. Cálculo del LD y LC por la desviación estándar de la respuesta analítica de placebos no adicionados de analito (S_w).

$$LD = \frac{3.3 \times 28.3161}{3508.0} = 0.0266 \frac{\mu g}{mL} \qquad LC = \frac{10 \times 28.3161}{3508.0} = 0.0807 \mu g/mL$$

7. Cálculo del LD y LC por la desviación estándar de la regresión ($S_{y/x}$).

$$LD = \frac{3.3 \times 32.14}{3508.0} = 0.0302 \frac{\mu g}{mL} \qquad LC = \frac{10 \times 32.14}{3508.0} = 0.0916 \mu g/mL$$

8. Cálculo del LD y LC por la desviación estándar de la ordenada al origen (S_a).

$$LD = \frac{3.3 \times 24.90}{3508.0} = 0.0234 \frac{\mu g}{mL} \qquad LC = \frac{10 \times 24.90}{3508.0} = 0.0710 \mu g/mL$$

Evaluación de Exactitud del valor calculado del LD y LC.

Se preparan de forma independiente seis muestras adicionadas de analito a una concentración de 0.4 $\mu g/mL$, ya que es la concentración evaluada cercana al LD y LC determinado.

EXACTITUD DEL MÉTODO — Para el LD y LC

Inyección	Nombre de la muestra	Área (AU)
1	Muestra adicionada M1	1386
2	Muestra adicionada M2	1400
3	Muestra adicionada M3	1393
4	Muestra adicionada M4	1409
5	Muestra adicionada M5	1376
6	Muestra adicionada M6	1390

Cálculos

Fórmulas empleadas

- Concentración recuperada [C_{RE}] y porcentaje de recobro (% R).
- Promedio aritmético (\bar{x}), desviación estándar (s), coeficiente de variación (CV) e intervalo de confianza para la media poblacional $IC(\mu)$.

Diagrama de procesamiento de datos

- Ver diagrama de procesamiento de datos de *Exactitud del método*.

Desarrollo de cálculos

1. Cálculo de concentración recuperada [C_{RE}].

$$\left(1. \frac{1386 \times 1.0 \frac{\mu g}{mL}}{3486} = 0.3976 \frac{\mu g}{mL} \right), \left(2. \frac{1400 \times 1.0 \frac{\mu g}{mL}}{3486} = 0.4016 \frac{\mu g}{mL} \right), \left(3. \frac{1393 \times 1.0 \frac{\mu g}{mL}}{3486} = 0.3996 \frac{\mu g}{mL} \right)$$

$$\left(4. \frac{1409 \times 1.0 \frac{\mu g}{mL}}{3486} = 0.4042 \frac{\mu g}{mL} \right), \left(5. \frac{1376 \times 1.0 \frac{\mu g}{mL}}{3486} = 0.3947 \frac{\mu g}{mL} \right), \left(6. \frac{1390 \times 1.0 \frac{\mu g}{mL}}{3486} = 0.3987 \frac{\mu g}{mL} \right)$$

2. Cálculo del porcentaje de recobro (% R).

$$\left(1. \frac{0.3976 \frac{\mu g}{mL}}{0.4 \frac{\mu g}{mL}} \times 100 \% = 99.40 \%\right), \left(2. \frac{0.4016 \frac{\mu g}{mL}}{0.4 \frac{\mu g}{mL}} \times 100 \% = 100.40 \%\right), \left(3. \frac{0.3996 \frac{\mu g}{mL}}{0.4 \frac{\mu g}{mL}} \times 100 \% = 99.90 \%\right)$$

$$\left(4. \frac{0.4042 \frac{\mu g}{mL}}{0.4 \frac{\mu g}{mL}} \times 100 \% = 101.05 \%\right), \left(5. \frac{0.3947 \frac{\mu g}{mL}}{0.4 \frac{\mu g}{mL}} \times 100 \% = 98.68 \%\right), \left(6. \frac{0.3987 \frac{\mu g}{mL}}{0.4 \frac{\mu g}{mL}} \times 100 \% = 99.68 \%\right)$$

Inyección	Concentración adicionada ($\mu\text{g/mL}$)	Concentración recuperada ($\mu\text{g/mL}$)	% R
1	0.4000	0.3976	99.40
2	0.4000	0.4016	100.40
3	0.4000	0.3996	99.90
4	0.4000	0.4042	101.05
5	0.4000	0.3890	98.68
6	0.4000	0.3987	99.68

3. Cálculo de Σx , promedio aritmético (\bar{x}), desviación estándar (s) y coeficiente de variación (CV) del porcentaje de recobro (% R).

$$\Sigma \bar{x} = 99.40 \% + 100.40\% + 99.90 + 101.05 + 98.68 + 99.68 \% = 599.11 \%$$

$$n = 6$$

$$\bar{x} = 599.11 \% / 6 = 99.85 \%$$

$$\Sigma(x - \bar{x})^2 = (99.40 - 99.85)^2 + (100.40 - 99.85)^2 + (99.90 - 99.85)^2 + (101.05 - 99.85)^2 + (98.68 - 99.85)^2 + (99.68 - 99.85)^2 = 8.4004$$

$$s = \sqrt{\frac{8.4004}{6 - 1}} = 0.82$$

$$CV = \frac{0.82}{99.61} \times 100 \% = 0.82 \approx 0.8 \%$$

EXACTITUD DEL MÉTODO — Para el LD y LC

Inyección	% R
1	99.40
2	100.40
3	99.90
4	101.05
5	98.68
6	99.68
\bar{x}	99.85
s	0.82
CV	0.8

4. Cálculo del intervalo de confianza para la media poblacional IC(μ).

$$IC(\mu) = 99.85 \% - 2.571 \times \frac{0.82}{\sqrt{6}} = 98.99\% \approx 99.0 \%$$

$$IC(\mu) = 99.85 \% + 2.571 \times \frac{0.82}{\sqrt{6}} = 100.71\% \approx 100.7 \%$$

INTERVALO DE CONFIANZA PARA LA MEDIA POBLACIONAL

IC (μ)	99.0	100.7
--------------	------	-------

Criterio de aceptación

Criterio de aceptación	Resultado de linealidad	Conclusión
$r^2 = \geq 0.98$	$r^2 \geq 0.9990$	Cumple
IC (β_1) debe incluir la unidad	IC (β_1) = 3444.6 — 3571.4	Cumple
<i>El LD debe ser menor a la especificación 1.0 $\mu\text{g/mL}$</i>	LD Sw = 0.0266 $\mu\text{g/mL}$ LD S y/x = 0.0302 $\mu\text{g/mL}$ LD Sa = 0.0234 $\mu\text{g/mL}$	El LD y LC calculado es menor a la especificación límite evaluada de 1.0 $\mu\text{g/mL}$
<i>El LC debe ser menor a la especificación 1.0 $\mu\text{g/mL}$</i>	LC Sw = 0.0807 $\mu\text{g/mL}$ LC S y/x = 0.0916 $\mu\text{g/mL}$ LC Sa = 0.0710 $\mu\text{g/mL}$	
Criterio de aceptación	Resultado de la comprobación del LD y LC	
CV del porcentaje de recobro no mayor a 2.0 %	$CV = 1.3 \%$	Cumple
El IC(μ) debe incluir el 100% o que el promedio aritmético del porcentaje de recobro se incluya en el intervalo: 98.0 % — 102.0 %	$IC(\mu) = 99.3 \% — 100.1$	Cumple

Incertidumbre

Los laboratorios de pruebas deben emitir un estimado de la incertidumbre, como parte del informe de resultados, cuando esto sea requerido por los usuarios, cuando el resultado del análisis va a ser utilizado para verificar su cumplimiento con un requisito de calidad, para el cumplimiento de la norma ISO/IEC 17025 (NMX 17025) respecto a la estimación de la incertidumbre de la medición asociada con las pruebas analíticas que producen resultados cuantitativos o continuos. ^[9]

El presente manual no tiene como objetivo establecer los criterios para llevar a cabo la estimación de la incertidumbre de métodos cuantitativos, no obstante, se enlistarán diversas fuentes bibliográficas donde se puede consultar para llevar a cabo dicha característica de desempeño analítico, en caso de ser requerida:

1. CCAYAC-CR-19/0. Criterios para estimar la incertidumbre de la medición.
2. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM) 13va Edición; 2021. Secretaría de Salud, Comisión permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos — *Apéndice IV. Estimación de la incertidumbre de métodos analíticos farmacopeicos.*
3. NMX-CH-140-IMNC-2002 Guía para la expresión de incertidumbre en las mediciones”.
4. Schmid, W.A., & Lazos, R. (2000). Guía para estimar la incertidumbre de la medición. *Centro Nacional de Metrología (abril 2004), 106.*

*Capítulo 4. Informe de validación de métodos
analíticos*

Descripción de un informe de validación

De acuerdo con el apéndice V. Principios generales de buenas prácticas de laboratorio de la FEUM 13va edición, indica que los resultados (datos analíticos obtenidos de la ejecución del protocolo validación aprobado) se documentan en el informe de validación. ^[5]

Elaborar un informe de resultados que incluya lo siguiente:

INFORME DE VALIDACIÓN ^[5]

Título	Informe de resultados de verificación. Señalar asimismo el nombre y clave del método que se validó.
Objetivo	Considerar los parámetros de desempeño a evaluar y el analito a determinar.
Campo de aplicación	Indicar el tipo de producto (s) para los cuales aplicó la validación.
Método de ensayo	Elaborar un diagrama de flujo simplificado, que señale la metodología empleada para cuantificar el analito (método interno).
Equipo	Descripción del nombre, marca, modelo, número de serie, número de identificación e intervalo de trabajo del equipo utilizado en la validación.
Materiales	<p>Descripción de:</p> <ol style="list-style-type: none"> Nombre, marca y lote del material de uso general utilizado. Nombre, marca, clave, volumen nominal y volumen real del material volumétrico empleado.
Reactivos	<ol style="list-style-type: none"> Indicar el nombre, marca, grado, pureza, presentación y lote de los reactivos utilizados. Indicar el nombre, marca, pureza o concentración, presentación y lote de los patrones de referencia utilizados Detallar la preparación de las soluciones de trabajo (soluciones que no requieren de un valor de título exacto) que se emplearon. Detallar la preparación de las soluciones de referencia (soluciones que requieren de un título exacto, soluciones stock, curva de calibración, etc.) que se utilizaron.

INFORME DE VALIDACIÓN ^[5]

Muestras	Indicar las características, forma de almacenamiento, marca, presentación, caducidad y cantidades de muestra utilizadas para llevar a cabo la validación. Detallar la preparación de los blancos de muestra o muestras adicionadas utilizadas.
Desarrollo experimental	Detallar cómo se llevaron a cabo los ensayos de cada uno de los parámetros de desempeño
Resultados	Presentación de resultados en forma de tablas, señalando fecha de inicio y termino, analistas, laboratorio, analito, matriz, unidades y registro primario.
Análisis de resultados	Presentar en forma de tabla los criterios de aceptación considerados y los resultados obtenidos y hacer las observaciones correspondientes.
Conclusión	Efectuar una conclusión en donde se señale que el método se ajusta al uso propuesto, debe indicar si los parámetros fueron acordes y por tanto el método puede utilizarse.
Bibliografía	Referencias utilizadas.
Anexos	Los que aplique: a. Bases de datos utilizadas. b. Cromatogramas, espectros, resultados impresos. c. Certificados de análisis o pureza. d. Certificados de trazabilidad. e. Certificados de calibración de material. f. Formatos de verificación de material. Gráficos de control, etc.

Los resultados deben ser evaluados, analizados y comparados contra los criterios de aceptación.

La conclusión del informe debe indicar si los parámetros fueron acordes y por tanto el método puede utilizarse. Si no se cumple con los criterios de aceptación, los resultados deben ser investigados, o si se aceptan deben ser justificados. Incluir firmas de quien elaboró, revisó y aprobó. ^[5]

*Capítulo 5. Ejercicios prácticos de una validación de
métodos analíticos*

Ejercicios prácticos de las características de desempeño analítico

Verificación del sistema (Aptitud del sistema)

1. Se pesan 19 mg de una sustancia de referencia A y 16 mg de una sustancia de referencia B, ambas se transfieren a un matraz volumétrico de 10 mL, se disuelve y lleva a volumen con la solución diluyente [1.9 mg/mL para A y 1.6 mg/mL para B].
 - a. Previo a continuar con el protocolo de validación aprobado, calcular promedio aritmético (\bar{x}) y el coeficiente de variación (CV), según aplique de las respuestas analíticas.
 - b. Determinar si los resultados analíticos cumplen con los siguientes criterios de aceptación:
 - $CV \leq 1.5 \%$
 - $\text{Platos teóricos}(N) \geq 2000$.
 - $\text{Resolución}(R) \geq 2.0$ entre los picos debido la sustancia de referencia A y B.

APTITUD DEL SISTEMA ANALISTA 1—DÍA 1

Inyección	Nombre de la muestra	Área (AU)	Tiempo de retención	Coleo USP	Platos teóricos	Resolución
1	Solución de referencia—Analito A	826568	2.1	1.8	1900	0.0
2	Solución de referencia—Analito A	760564	2.1	1.9	1992	0.0
3	Solución de referencia—Analito A	819468	2.2	1.9	2033	0.0
4	Solución de referencia—Analito A	751518	2.1	1.9	1974	0.0
5	Solución de referencia—Analito A	786767	2.1	1.9	1911	0.0
6	Solución de referencia—Analito A	786505	2.1	1.9	1996	0.0

APTITUD DEL SISTEMA ANALISTA 1—DÍA 1

Inyección	Nombre de la muestra	Área (AU)	Tiempo de retención	Coleo USP	Platos teóricos	Resolución
1	Solución de referencia—Analito B	666135	5.3	1.1	6137	4.8
2	Solución de referencia—Analito B	660511	5.3	1.1	6167	4.8
3	Solución de referencia—Analito B	659525	5.2	1.2	6185	4.8
4	Solución de referencia—Analito B	656269	5.3	1.1	6196	4.8
5	Solución de referencia—Analito B	662003	5.3	1.1	6170	4.8
6	Solución de referencia—Analito B	657003	5.2	1.2	6189	4.8

APTITUD DEL SISTEMA ANALISTA 2—DÍA 1

Inyección	Nombre de la muestra	Área (AU)	Tiempo de retención	Coleo USP	Platos teóricos	Resolución
1	Solución de referencia—Analito A	753015	2.0	1.9	1889.0	0.0
2	Solución de referencia—Analito A	801157	2.1	1.9	2010.0	0.0
3	Solución de referencia—Analito A	815792	2.1	1.9	2047.0	0.0
4	Solución de referencia—Analito A	808412	2.1	1.9	2028.0	0.0
5	Solución de referencia—Analito A	820879	2.0	1.8	1960.0	0.0
6	Solución de referencia—Analito A	783450	2.1	1.9	1966.0	0.0

APTITUD DEL SISTEMA ANALISTA 2—DÍA 1

Inyección	Nombre de la muestra	Área (AU)	Tiempo de retención	Coleo USP	Platos teóricos	Resolución
1	Solución de referencia—Analito B	669949	5.2	1.1	6107.0	4.8
2	Solución de referencia—Analito B	671082	5.3	1.2	6122.0	4.8
3	Solución de referencia—Analito B	662424	5.3	1.1	6162.0	4.8
4	Solución de referencia—Analito B	664886	5.3	1.2	6145.0	4.8
5	Solución de referencia—Analito B	658015	5.3	1.2	6116.0	4.8
6	Solución de referencia—Analito B	667263	5.2	1.1	6127.0	4.8

Precisión del sistema

2. Se pesan 48 mg de sustancia de referencia transfiriendo a un matraz volumétrico de 20 mL, se disuelve y lleva a volumen con la solución diluyente [2.40 mg/mL].

A partir de la solución anterior se toma una alícuota de 3.0 mL, se coloca en un matraz volumétrico de 10 mL llevándolo al aforo [0.72 mg/mL]. Dichas soluciones se realizan por sextuplicado.

- Calcular el promedio aritmético (\bar{x}), la desviación estándar (s) y el coeficiente de variación (CV) de las respuestas analíticas.
- Determinar si los resultados analíticos cumplen con el siguiente criterio de aceptación:
 - $CV \leq 1.5 \%$

Los resultados analíticos obtenidos son los siguientes:

PRECISIÓN DEL SISTEMA

Inyección	Nombre de la muestra	Área (AU)
1	Solución referencia 1	1045951
2	Solución referencia 2	1046583
3	Solución referencia 3	1045059
4	Solución referencia 4	1049256
5	Solución referencia 5	1047799
6	Solución referencia 6	1042673

Linealidad del sistema

3. Se preparan por triplicado una solución stock de referencia a una concentración 3.04 mg/mL. Conforme a la siguiente tabla, se prepararon 3 curvas de calibración al 40 %, 60 %, 80 %, 100 % y 120 %

Nivel %	Solución stock de referencia (mL)	Volumen de aforo (mL)	Concentración de referencia [mg/mL]
40	2.0	10.0	0.6080
60	3.0	10.0	0.9120
80	4.0	10.0	1.2160
100	5.0	10.0	1.5200
120	6.0	10.0	1.8240

- Graficar los valores de respuesta analítica (y) obtenidos en función de cada uno de los valores de concentración adicionada (x).
- Calcular el valor de la pendiente (b), la ordenada al origen (a), coeficiente de determinación (r^2) y el intervalo de confianza para la pendiente $IC(\beta_1)$.
- Determinar si los resultados analíticos cumplen con los siguientes criterios de aceptación:
 - $r^2 \geq 0.98$.
 - $IC(\beta_1)$ no debe incluir el cero.

Los resultados analíticos obtenidos son los siguientes:

LINEALIDAD DEL SISTEMA

Inyección	Nombre de la muestra	Concentración (mg/mL) (x)	Área (AU) (y)
1	Solución referencia 40% - CC 1	0.6080	584354
2	Solución referencia 40% - CC 2	0.6080	573840
3	Solución referencia 40% - CC 3	0.6080	573837
4	Solución referencia 60% - CC 1	0.9120	877571
5	Solución referencia 60% - CC 2	0.9120	864918
6	Solución referencia 60% - CC 3	0.9120	868113
7	Solución referencia 80% - CC 1	1.2160	1151457
8	Solución referencia 80% - CC 2	1.2160	1159781
9	Solución referencia 80% - CC 3	1.2160	1160840
10	Solución referencia 100% - CC 1	1.5200	1453669
11	Solución referencia 100% - CC 2	1.5200	1430911
12	Solución referencia 100% - CC 3	1.5200	1438081

LINEALIDAD DEL SISTEMA

Inyección	Nombre de la muestra	Concentración (mg/mL) (x)	Área (AU) (y)
13	Solución referencia 120% - CC 1	1.8240	1744561
14	Solución referencia 120% - CC 2	1.8240	1737715
15	Solución referencia 120% - CC 3	1.8240	1713799

4. Se pesan 36 mg de sustancia de referencia por triplicado, cada una de estas se transfieren a un matraz volumétrico de 25 mL, se disuelven y aforan con la solución diluyente, concentración final de 1.4 mg/mL.

Conforme a la siguiente tabla, se preparan 3 curvas de calibración al 40%, 60%, 80%, 100% y 120%

Nivel %	Solución stock de referencia (mL)	Volumen de aforo (mL)	Concentración de referencia [mg/mL]
40	2.0	10.0	0.6080
60	3.0	10.0	0.9120
80	4.0	10.0	1.2160
100	5.0	10.0	1.5200
120	6.0	10.0	1.8240

- Graficar los valores de respuesta analítica (y) obtenidos en función de cada uno de los valores de concentración adicionada (x).
- Calcular el valor de la pendiente (b), la ordenada al origen (a), coeficiente de determinación (r^2) y el intervalo de confianza para la pendiente $IC(\beta_1)$
- Determinar si los resultados analíticos cumplen con los siguientes criterios de aceptación:
 - $r^2 \geq 0.98$.
 - $IC(\beta_1)$ no debe incluir el cero.

Los resultados analíticos obtenidos son los siguientes:

LINEALIDAD DEL SISTEMA

Inyección	Nombre de la muestra	Concentración (mg/mL) (x)	Área (y)
1	Solución referencia 40% - CC 1	0.1440	390774
2	Solución referencia 40% - CC 2	0.1440	396390
3	Solución referencia 40% - CC 3	0.1440	391359

LINEALIDAD DEL SISTEMA

Inyección	Nombre de la muestra	Concentración (mg/mL) (x)	Área (y)
4	Solución referencia 60% - CC 1	0.2880	571194
5	Solución referencia 60% - CC 2	0.2880	567068
6	Solución referencia 60% - CC 3	0.2880	573615
7	Solución referencia 80% - CC 1	0.4320	765259
8	Solución referencia 80% - CC 2	0.4320	782278
9	Solución referencia 80% - CC 3	0.4320	771211
10	Solución referencia 100% - CC 1	0.5760	972907
11	Solución referencia 100% - CC 2	0.5760	955850
12	Solución referencia 100% - CC 3	0.5760	956921
13	Solución referencia 120% - CC 1	0.7200	1206550
14	Solución referencia 120% - CC 2	0.7200	1149762
15	Solución referencia 120% - CC 3	0.7200	1184044

Especificidad

5. Para evaluar la especificidad separando cada analito de una solución mezcla de compuestos aromáticos (1) alcohol bencílico, (2) fenol, (3) 3',4'-dimetoxiacetofenona, (4) benzoína, (5) benzoato de etilo, (6) tolueno, (7) 2,6-dimetoxitolueno, (8) o-metoxibifenilo

Se emplea el siguiente sistema cromatográfico

- Columna Hypersil ODS (C18 sobre sílice de 5 μm) de 0.46 x 25 cm.
- Flujo de 1,0 mL/min.
- Temperatura de horno de columna de 22 °C.
- El eluyente estaba formado por un amortiguador acuoso (designado por A) y acetonitrilo (designado por B). El amortiguador contenía KH_2PO_4 25 mM y 0,1 g/L de azida de sodio con el pH ajustado a 3,5 con HCl.

De acuerdo con la Figura 4, el cromatograma 1, se obtiene a una relación de 90 % de B y un 10 % de A, del cual solo se observan tres picos, porque los restantes están solapados, debido a ello se decide optimizar el método analítico mediante dos tipos de elución, las cuales consistieron en lo siguiente:

Elución isocrática (cromatograma 2). Se redujo la fuerza eluyente del disolvente orgánico ajustando al 35 % el contenido de B, en donde los picos quedan bien resueltos.

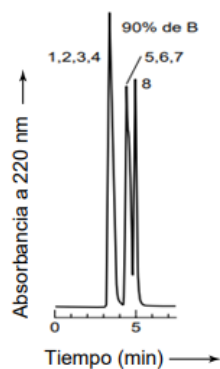
Elución en gradiente (cromatograma 3). Primero se trabaja con un 30% de B durante 8 minutos, a continuación, se aumenta de forma continua la fuerza eluyente durante 5 minutos hasta alcanzar un 45% de B, y se mantuvo durante 15 minutos. Finalmente se modifica el disolvente hasta alcanzar un 80% de B en 2 minutos, manteniéndose esa composición para resolver los últimos picos.

- a. Determinar ¿Cuál y por qué es la mejor elución por emplear para realizar la validación del método analítico conforme al sistema cromatográfico mencionado?

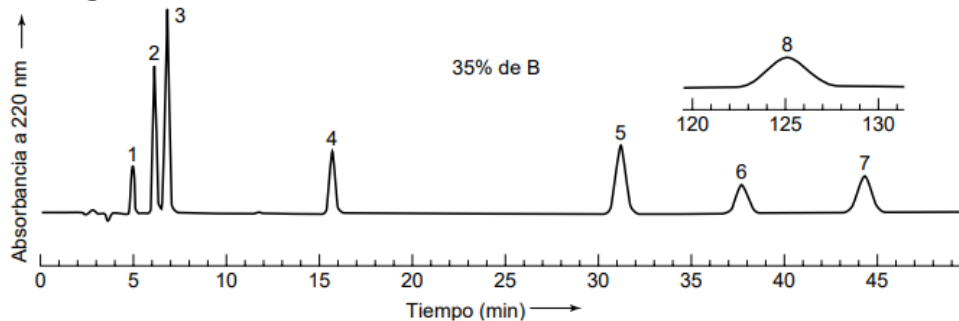
Figura 4

Separación isocrática y en gradiente de cromatografía de líquidos.

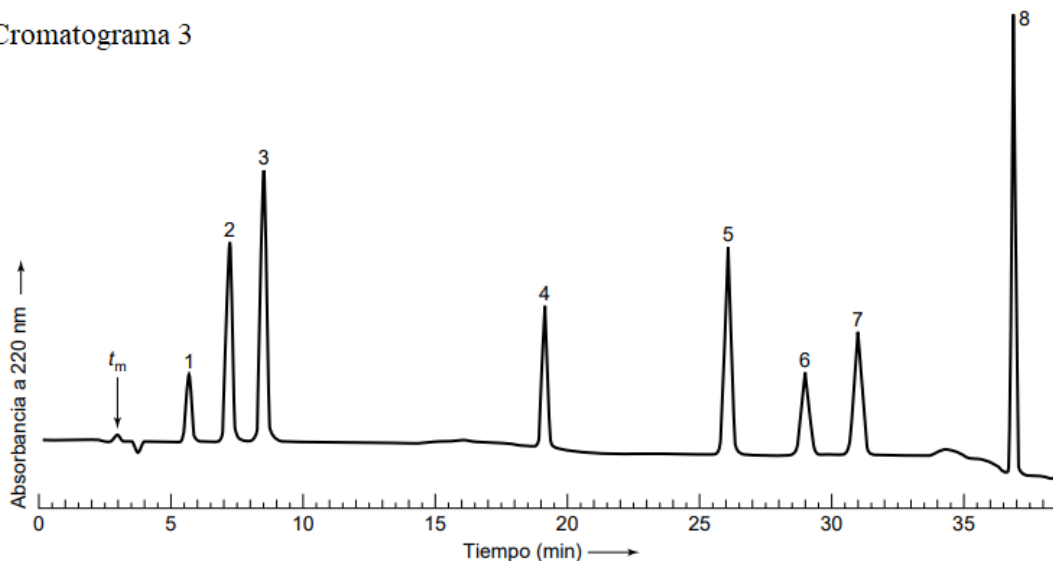
Cromatograma 1



Cromatograma 2



Cromatograma 3



Nota. Adaptado de C. Harris, D. (2016). *Análisis químico cuantitativo. Sexta Edición.* W. H. Freeman and Company, New York and Basingstoke.

Estabilidad analítica

6. Se evalúan por triplicado la estabilidad de una muestra de placebo adicionado preparada a una concentración de 0.40 mg/mL correspondiente al 100 % de la concentración a evaluar, en tres días diferentes.

Dichas muestras preparadas se someten a un almacenamiento de temperatura de refrigeración controlada (2 a 8 ° C). Las muestras se analizan aproximadamente a los tiempos 0 horas (inicial), 12 horas, 24 horas y 48 horas.

Cada resultado analítico debe ser evaluado mediante el porcentaje de recobro (% *R*) respecto a la solución de referencia preparada para cada día evaluado a una concentración de 0.40 mg/mL

- a. Calcular el valor del promedio aritmético (\bar{x}) del porcentaje de recobro (% *R*) de los diferentes tiempos evaluados y la diferencia absoluta porcentual de la media aritmética $|d_i|$ de cada tiempo respecto al análisis inicial.
- b. Determinar si los resultados obtenidos cumplen con los siguientes criterios de aceptación:
 - $|d_i| \leq 2.0 \%$ de cada tiempo respecto al análisis inicial.

Los resultados analíticos obtenidos son los siguientes:

Área promedio de solución de referencia — 0 y 12 horas (Día 1) = 4297982 AU

Área promedio de solución de referencia — 24 horas (Día 2) = 4269421 AU

Área promedio de solución de referencia — 48 horas (Día 3) = 4281056 AU

ESTABILIDAD ANALÍTICA DE LA MUESTRA

Dato	Nombre de la muestra	Área (AU)
1	Placebo adicionado 0 horas (inicial)	4280396
2	Placebo adicionado 0 horas (inicial)	4283583
3	Placebo adicionado 0 horas (inicial)	4296660
1	Placebo adicionado 12 horas	4284332
2	Placebo adicionado 12 horas	4294726
3	Placebo adicionado 12 horas	4299560
1	Placebo adicionado 24 horas	4301355
2	Placebo adicionado 24 horas	4311719
3	Placebo adicionado 24 horas	4314174
1	Placebo adicionado 48 horas	4357729
2	Placebo adicionado 48 horas	4367428
3	Placebo adicionado 48 horas	4359486

7. Se determina la estabilidad analítica de la solución muestra adicionada de analito a una concentración 0.9 mg/mL correspondiente al 100 % de la concentración a evaluar en dos días diferentes a temperatura de automuestreador de 15 °C, las muestras preparadas se evalúan en los intervalos de tiempo 0 (inicial), 12 horas y 24 horas.

Cada resultado analítico debe ser evaluado mediante el porcentaje de recobro (% *R*) respecto a la solución de referencia preparada para cada día evaluado a una concentración de 0.9 mg/mL.

- a. Calcular el valor del promedio aritmético (\bar{x}) del porcentaje de recobro (% *R*) de los diferentes tiempos evaluados y la diferencia absoluta porcentual de la media aritmética $|d_i|$ de cada tiempo respecto al análisis inicial.
- b. Determinar si los resultados obtenidos cumplen con los siguientes criterios de aceptación:
 - $|d_i| \leq 2.0$ % de cada tiempo respecto al análisis inicial.

Los resultados analíticos obtenidos son los siguientes:

Área promedio de solución de referencia — 0, 6 y 12 horas (Día 1) = 4297982 AU

Área promedio de solución de referencia — 24 horas (Día 2) = 4269421 AU

ESTABILIDAD ANALÍTICA DE LA MUESTRA

Dato	Nombre de la muestra	Área (AU)
1	Muestra adicionada 0 horas (inicial)	8571788
2	Muestra adicionada 0 horas (inicial)	8588462
3	Muestra adicionada 0 horas (inicial)	8595844
1	Muestra adicionada 6 horas	8578921
2	Muestra adicionada 6 horas	8585739
3	Muestra adicionada 6 horas	8591504
1	Muestra adicionada 12 horas	8630889
2	Muestra adicionada 12 horas	8648989
3	Muestra adicionada 12 horas	8662569
1	Muestra adicionada 24 horas	8685956
2	Muestra adicionada 24 horas	8697234
3	Muestra adicionada 24 horas	8691282

Exactitud del método

8. Se preparan de forma independiente seis muestras adicionadas de analito a una concentración de 4.6 mg/mL correspondiente al 100 % de la concentración a evaluar.
- a. Calcular el promedio aritmético (\bar{x}), la desviación estándar (*s*), el coeficiente de variación (*CV*) y el sesgo por medio del intervalo de confianza para la media poblacional $IC(\mu)$ del porcentaje de recobro.

b. Determinar si los resultados obtenidos cumplen con los siguientes criterios de aceptación:

- El CV del porcentaje de recobro es no mayor a 2.0 %
- El $IC(\mu)$ debe incluir el 100% o que el promedio aritmético del porcentaje de recobro se incluya en el intervalo 98.0 % — 102.0 %

Los resultados analíticos obtenidos son los siguientes:

Área promedio de solución de referencia = 7158120 AU

EXACTITUD DEL MÉTODO		
Inyección	Nombre de la muestra	Área (AU)
1	Muestra adicionada M1	7065875
2	Muestra adicionada M2	7095864
3	Muestra adicionada M3	7143973
4	Muestra adicionada M4	7069304
5	Muestra adicionada M5	7148023
6	Muestra adicionada M6	7175133

9. Se preparan de forma independiente seis muestras de placebo adicionado de analito a una concentración de 1.96 mg/mL correspondiente al 100 % de la concentración a evaluar.

- Calcular el promedio aritmético (\bar{x}), la desviación estándar (s), el coeficiente de variación (CV) y el sesgo por medio del intervalo de confianza para la media poblacional $IC(\mu)$ del porcentaje de recobro.
- Determinar si los resultados obtenidos cumplen con los siguientes criterios de aceptación:
 - El CV del porcentaje de recobro es no mayor a 2.0 %
 - El $IC(\mu)$ debe incluir el 100% o que el promedio aritmético del porcentaje de recobro se incluya en el intervalo 98.0 % — 102.0 %

Los resultados analíticos obtenidos son los siguientes:

Área promedio de solución de referencia = 3162107 AU

EXACTITUD DEL MÉTODO		
Inyección	Nombre de la muestra	Área (AU)
1	Placebo adicionado M1	3222466
2	Placebo adicionado M2	3216999
3	Placebo adicionado M3	3235756
4	Placebo adicionado M4	3224276
5	Placebo adicionado M5	3212390
6	Placebo adicionado M6	3196428

Linealidad e intervalo del método

10. Se preparan por triplicado una solución stock de referencia y muestra adicionada de analito de concentración 5.3 mg/mL.

Conforme a la siguiente tabla, se prepararon 3 curvas de calibración al 80 %, 100 % y 120 %

Nivel %	Solución stock de referencia (mL)	Solución stock de muestra (mL)	Volumen de aforo (mL)	Concentración de referencia [mg/mL]
80	2.0	2.0	10.0	2.1200
100	2.5	2.5	10.0	2.6500
120	3.0	3.0	10.0	3.1800

- Graficar los valores de respuesta analítica obtenida en función de cada uno de los valores de concentración adicionada vs concentración recuperada.
- Evaluar la calidad de ajuste por medio del cálculo del coeficiente de determinación (r^2) la desviación estándar de la regresión ($S_{y/x}$) y el coeficiente de variación de regresión ($CV_{y/x}$), reportar el sesgo del ajuste mediante el intervalo de confianza de la pendiente $IC(\beta_1)$ y el intervalo de confianza de la ordenada al origen $IC(\beta_0)$.
- Evaluar la exactitud del porcentaje de recobro ($\% R$), por medio del cálculo del promedio aritmético (\bar{x}), la desviación estándar (s), y el coeficiente de variación (CV), reportar el sesgo por medio del intervalo de confianza para la media poblacional $IC(\mu)$ del porcentaje de recobro.
- Determinar si los resultados obtenidos cumplen con los siguientes criterios de aceptación:

Concentración adicionada vs concentración recuperada.

- $r^2 \geq 0.98$
- $IC(\beta_1)$ debe incluir la unidad.
- $IC(\beta_0)$ debe incluir el cero.
- $CV_{y/x}$ del porcentaje de recobro no debe ser mayor a 2.0 %
- El $IC(\mu)$ debe incluir el 100% o que el promedio aritmético del porcentaje de recobro se incluya en el intervalo de 98.0 % - 102.0 %
- El CV del porcentaje de recobro no debe ser mayor 2.0 %

Los resultados analíticos obtenidos son los siguientes:

Área promedio de solución de referencia = 2850691 AU

LINEALIDAD DEL MÉTODO

Inyección	Nombre de la muestra	Concentración adicionada (mg/mL)	Área (AU)
1	Muestra adicionada 80% — CC 1	2.1200	2260389
2	Muestra adicionada 80% — CC 2	2.1200	2246187
3	Muestra adicionada 80% — CC 3	2.1200	2275101
4	Muestra adicionada 100% — CC 1	2.6500	2899786
5	Muestra adicionada 100% — CC 2	2.6500	2885328
6	Muestra adicionada 100% — CC 3	2.6500	2814886
7	Muestra adicionada 120% — CC 1	3.1800	3379012
8	Muestra adicionada 120% — CC 2	3.1800	3464319
9	Muestra adicionada 120% — CC 3	3.1800	3388788

11. Se preparan por triplicado una solución stock de referencia y muestra adicionada de analito de concentración 3.32 mg/mL.

Conforme a la siguiente tabla, se prepararon 3 curvas de calibración al 80 %, 100 % y 120 %

Nivel %	Solución stock de referencia (mL)	Solución stock de muestra (mL)	Volumen de aforo (mL)	Concentración de referencia [mg/mL]
80	2.0	2.0	20.0	0.6640
100	2.5	2.5	20.0	0.8300
120	3.0	3.0	20.0	0.9960

- Graficar los valores de respuesta analítica obtenida en función de cada uno de los valores de concentración adicionada vs concentración recuperada.
- Evaluar la calidad de ajuste por medio del cálculo del coeficiente de determinación (r^2) la desviación estándar de la regresión ($S_{y/x}$) y el coeficiente de variación de regresión ($CV_{y/x}$), reportar el sesgo del ajuste mediante el intervalo de confianza de la pendiente $IC(\beta_1)$ y el intervalo de confianza de la ordenada al origen $IC(\beta_0)$.
- Evaluar la exactitud del porcentaje de recobro ($\% R$), por medio del cálculo del promedio aritmético (\bar{x}), la desviación estándar (s), y el coeficiente de variación (CV), reportar el sesgo por medio del intervalo de confianza para la media poblacional $IC(\mu)$ del porcentaje de recobro.
- Determinar si los resultados obtenidos cumplen con los siguientes criterios de aceptación:

Concentración adicionada vs concentración recuperada.

- $r^2 \geq 0.98$
- $IC(\beta_1)$ debe incluir la unidad.
- $IC(\beta_0)$ debe incluir el cero.
- $CV_{y/x}$ del porcentaje de recobro no debe ser mayor a 2.0 %

Concentración adicionada vs concentración recuperada.

- El $IC(\mu)$ debe incluir el 100% o que el promedio aritmético del porcentaje de recobro se incluya en el intervalo de 98.0 % - 102.0 %
- El CV del porcentaje de recobro no debe ser mayor 2.0 %

Los resultados analíticos obtenidos son los siguientes:

Área promedio de solución de referencia = 5045723 AU

LINEALIDAD DEL MÉTODO

Inyección	Nombre de la muestra	Concentración adicionada (mg/mL)	Área (AU)
1	Muestra adicionada 80% — CC 1	0.6640	3987779
2	Muestra adicionada 80% — CC 2	0.6640	4027169
3	Muestra adicionada 80% — CC 3	0.6640	4194938
4	Muestra adicionada 100% — CC 1	0.8300	5181646
5	Muestra adicionada 100% — CC 2	0.8300	5008433
6	Muestra adicionada 100% — CC 3	0.8300	4871232
7	Muestra adicionada 120% — CC 1	0.9960	5826920
8	Muestra adicionada 120% — CC 2	0.9960	5956412
9	Muestra adicionada 120% — CC 3	0.9960	6042679

Precisión del método

12. La repetibilidad se evalúa durante el primer día de validación realizada por el analista 1 en el día 1 de la validación, esta se determina por medio de los resultados de Exactitud del método, analizando seis muestras de analito adicionado preparadas de forma independiente a una concentración de 1.64 mg/mL correspondiente al 100 % de la concentración a evaluar.

La reproducibilidad intralaboratorio (precisión intermedia) se evalúa, por dos analistas en dos días diferentes. analizando tres muestras de analito adicionado preparadas de forma independiente a una concentración de 1.64 mg/mL correspondiente al 100 % de la concentración a evaluar.

El porcentaje de recobro se debe calcular conforme a los resultados obtenidos una la solución de referencia preparada a una concentración de 1.64 mg/mL por cada analista y día, dichas soluciones se emplean para la determinación de Verificación del sistema (Aptitud del sistema) de los días evaluados.

Para repetibilidad:

- Calcular el promedio aritmético (\bar{x}), la desviación estándar (s), el coeficiente de variación (CV) del porcentaje de recobro.
- Determinar si los resultados obtenidos cumplen con el siguiente criterio de aceptación:
 - El CV del porcentaje de recobro es no mayor a 2.0 %

Para reproducibilidad intralaboratorio (precisión intermedia):

- c. Calcular el valor del promedio aritmético (\bar{x}), la desviación estándar (s) y el coeficiente de variación (CV) del porcentaje de recobro.
- d. Verificar la significancia estadística de los datos mediante una prueba de ANOVA de un factor, formulando una hipótesis nula (H_0) para indicar que hay igualdad y una hipótesis alterna (H_1) para indicar que no hay igualdad, con un nivel de significancia de 0.05.
- e. Determinar si los resultados obtenidos cumplen con el siguiente criterio de aceptación:
 - El CV del porcentaje de recobro es no mayor a 2.0 %

Los resultados analíticos obtenidos son los siguientes:

Área promedio de solución de referencia — Analista 1 – Día 1 = 485594 AU

Área promedio de solución de referencia — Analista 2 – Día 1 = 489037 AU

Área promedio de solución de referencia — Analista 1 – Día 2 = 484246 AU

Área promedio de solución de referencia — Analista 2 – Día 2 = 489480 AU

REPETIBILIDAD (EXACTITUD DEL MÉTODO)

Inyección	Nombre de la muestra	Área (AU)
1	Muestra adicionada M1	481863
2	Muestra adicionada M2	485268
3	Muestra adicionada M3	484913
4	Muestra adicionada M4	482159
5	Muestra adicionada M5	488910
6	Muestra adicionada M6	482840

Reproducibilidad intralaboratorio (precisión intermedia)

Dato	Nombre de la muestra	Área (AU)
1	Muestra adicionada A1-D1	490351
2	Muestra adicionada A1-D1	493075
3	Muestra adicionada A1-D1	487418
4	Muestra adicionada A2-D1	483819
5	Muestra adicionada A2-D1	489243
6	Muestra adicionada A2-D1	486614
7	Muestra adicionada A1-D2	486563
8	Muestra adicionada A1-D2	489154
9	Muestra adicionada A1-D2	486159
10	Muestra adicionada A2-D2	493166
11	Muestra adicionada A2-D2	492679
12	Muestra adicionada A2-D2	493247

13. Se evalúa la repetibilidad mediante el procedimiento de linealidad e intervalo del método, se prepara por triplicado una solución stock de referencia y placebo adicionado de analito de concentración 4.8 mg/mL.

Conforme a la siguiente tabla, se preparan 3 curvas de calibración al 80 %, 100 % y 120 %

Nivel %	Solución stock de referencia (mL)	Solución stock de muestra (mL)	Volumen de aforo (mL)	Concentración de referencia [mg/mL]
80	2.0	2.0	20.0	0.9600
100	2.5	2.5	20.0	1.2000
120	3.0	3.0	20.0	1.4400

La reproducibilidad intralaboratorio (precisión intermedia) se evalúa, por dos analistas en dos días diferentes. analizando tres muestras de analito adicionado preparadas de forma independiente a una concentración de 1.2 mg/mL correspondiente al 100 % de la concentración a evaluar.

El porcentaje de recobro se debe calcular conforme a los resultados obtenidos una la solución de referencia preparada a una concentración de 1.2 mg/mL por cada analista y día, dichas soluciones fueron empleada para la determinación de Verificación del sistema (Aptitud del sistema) de los días evaluados.

Para repetibilidad:

- a. Calcular el coeficiente de variación (CV) del porcentaje de recobro y coeficiente de variación de regresión ($CV_{y/x}$), es decir, el coeficiente de variación de la relación concentración recuperada contra concentración adicionada. Además de los cálculos requeridos para la linealidad del e intervalo del método:
 - I. Graficar los valores de respuesta analítica obtenida en función de cada uno de los valores de concentración adicionada vs concentración recuperada.
 - II. Evaluar la calidad de ajuste por medio del cálculo del coeficiente de determinación (r^2) la desviación estándar de la regresión ($S_{y/x}$) y el coeficiente de variación de regresión ($CV_{y/x}$), reportar el sesgo del ajuste mediante el intervalo de confianza de la pendiente $IC(\beta_1)$ y el intervalo de confianza de la ordenada al origen $IC(\beta_0)$.
 - III. Evaluar la exactitud del porcentaje de recobro ($\% R$), por medio del cálculo del promedio aritmético (\bar{x}), la desviación estándar (s), y el coeficiente de variación (CV), reportar el sesgo por medio del intervalo de confianza para la media poblacional $IC(\mu)$ del porcentaje de recobro.
- b. Determinar si los resultados obtenidos cumplen con los siguientes criterios de aceptación:
 - El CV del porcentaje de recobro no debe ser mayor 2.0 %
 - $CV_{y/x}$ del porcentaje de recobro no debe ser mayor a 2.0 %

Además de los siguientes criterios para la linealidad del e intervalo del método:

Concentración adicionada vs concentración recuperada.

- $r^2 \geq 0.98$
- $IC(\beta_1)$ debe incluir la unidad.
- $IC(\beta_0)$ debe incluir el cero.
- El $IC(\mu)$ debe incluir el 100% o que el promedio aritmético del porcentaje de recobro se incluya en el intervalo de 98.0 % - 102.0 %

Para reproducibilidad intralaboratorio (precisión intermedia):

- Calcular el valor del promedio aritmético (\bar{x}), la desviación estándar (s) y el coeficiente de variación (CV) del porcentaje de recobro.
- Verificar la significancia estadística de los datos mediante una prueba de ANOVA de un factor, formulando una hipótesis nula (H_0) para indicar que hay igualdad y una hipótesis alterna (H_1) para indicar que no hay igualdad, con un nivel de significancia de 0.05.
- Determinar si los resultados obtenidos cumplen con el siguiente criterio de aceptación:
 - El CV del porcentaje de recobro es no mayor a 2.0 %

Los resultados analíticos obtenidos son los siguientes:

Área promedio de solución de referencia — Analista 1 – Día 1 = 3391667 AU

Área promedio de solución de referencia — Analista 2 – Día 1 = 3364119 AU

Área promedio de solución de referencia — Analista 1 – Día 2 = 3416843 AU

Área promedio de solución de referencia — Analista 2 – Día 2 = 3385275 AU

LINEALIDAD DEL MÉTODO

Inyección	Nombre de la muestra	Concentración adicionada (mg/mL)	Área (AU)
1	Placebo adicionado 80% — CC 1	0.9600	2709030
2	Placebo adicionado 80% — CC 2	0.9600	2675780
3	Placebo adicionado 80% — CC 3	0.9600	2698771
4	Placebo adicionado 100% — CC 1	1.2000	3438509
5	Placebo adicionado 100% — CC 2	1.2000	3447330
6	Placebo adicionado 100% — CC 3	1.2000	3437243
7	Placebo adicionado 120% — CC 1	1.4400	4104702
8	Placebo adicionado 120% — CC 2	1.4400	4109325
9	Placebo adicionado 120% — CC 3	1.4400	4086307

Reproducibilidad intralaboratorio (precisión intermedia)

Dato	Nombre de la muestra	Área (AU)
1	Muestra adicionada A1-D1	3427193
2	Muestra adicionada A1-D1	3421319
3	Muestra adicionada A1-D1	3436785
4	Muestra adicionada A2-D1	3395844
5	Muestra adicionada A2-D1	3399261
6	Muestra adicionada A2-D1	3401771
7	Muestra adicionada A1-D2	3446148
8	Muestra adicionada A1-D2	3455092
9	Muestra adicionada A1-D2	3445469
10	Muestra adicionada A2-D2	3423177
11	Muestra adicionada A2-D2	3425442
12	Muestra adicionada A2-D2	3414750

Tolerancia del método

14. A partir de una misma muestra adicionada de analito preparada a una concentración de 0.55 mg/mL correspondiente al 100 % de la concentración a evaluar, se inyectan 3 viales por cada factor analizado:

- 1er factor — Uso de reactivos empleados en la preparación de la fase móvil (Acuosa/Orgánica) y la solución diluyente, durante la validación del método analítico.
- 2do factor — Uso de diferentes lotes de reactivos, en los cuales se ven implicadas la preparación de la fase móvil (Acuosa/Orgánica) y la solución diluyente.

Previo a la inyección de las muestras preparadas, se verifica que se cumplan los criterios de la Verificación del sistema — Aptitud del sistema ($CV \leq 2.0$).

- a. Calcular el valor del promedio aritmético (\bar{x}), la desviación estándar (s) y el coeficiente de variación (CV) del porcentaje de recobro ($\% R$) de todas las condiciones de uso fijadas.
- b. Determinar si los resultados obtenidos cumplen con el siguiente criterio de aceptación:
 - $CV \leq 2.0 \%$

Los resultados analíticos obtenidos son los siguientes:

Área promedio solución de referencia Factor 1: 4028233 AU

Área promedio solución de referencia Factor 2: 3973260 AU

TOLERANCIA DEL MÉTODO

Dato	Nombre de la muestra	Área (AU)
1	Muestra adicionada 1 — Reactivos Lote 1	4021474
2	Muestra adicionada 2 — Reactivos Lote 1	3992023
3	Muestra adicionada 3 — Reactivos Lote 1	4042568
1	Muestra adicionada 1 — Reactivos Lote 2	4006420
2	Muestra adicionada 2 — Reactivos Lote 2	4002306
3	Muestra adicionada 3 — Reactivos Lote 2	4041288

15. A partir de una misma muestra adicionada de analito preparada a una concentración de 1.3 mg/mL correspondiente al 100 % de la concentración a evaluar, se inyectan 6 viales por cada factor analizado:

- 1er factor — Uso del cromatógrafo de líquidos de alta resolución (CLAR) empleado durante la validación del método analítico.
- 2do factor — Uso de un segundo cromatógrafo de líquidos de alta resolución (CLAR) empleado durante la validación del método analítico.

Previo a la inyección de las muestras preparadas, se verifica que se cumplan los criterios de la Verificación del sistema — Aptitud del sistema ($CV \leq 2.0$).

- Calcular el valor del promedio aritmético (\bar{x}), la desviación estándar (s) y el coeficiente de variación (CV) del porcentaje de recobro ($\% R$) de todas las condiciones de uso fijadas.
- Determinar si los resultados obtenidos cumplen con el siguiente criterio de aceptación:
 - $CV \leq 2.0 \%$

Los resultados analíticos obtenidos son los siguientes:

Área promedio solución de referencia Factor 1: 4028233 AU

Área promedio solución de referencia Factor 2: 3973260 AU

TOLERANCIA DEL MÉTODO

Dato	Nombre de la muestra	Área (AU)
1	Muestra adicionada 1 — Reactivos Lote 1	4021474
2	Muestra adicionada 2 — Reactivos Lote 1	3992023
3	Muestra adicionada 3 — Reactivos Lote 1	4042568
1	Muestra adicionada 1 — Reactivos Lote 2	4006420
2	Muestra adicionada 2 — Reactivos Lote 2	4002306
3	Muestra adicionada 3 — Reactivos Lote 2	4041288

Robustez del método

Desarrollo por determinación de la investigación de tres factores como máximo.

16. Se evalúan los siguientes factores: longitud de onda, velocidad de flujo y proporción de fases. Dichos factores fueron fijados bajo el concepto de “cambios pequeños y deliberados” respecto al nivel normal de operación indicado en el método analítico a validar, conforme se indica a continuación:

Análisis	Factor de análisis	Modificación
R0	Condición normal	Sin modificación
R1	Longitud de onda 243 nm	240 nm
R2	Longitud de onda 243 nm	246 nm
R3	Velocidad de flujo	0.8 mL/min
R4	Velocidad de flujo	1.2 mL/min
R5	Proporción de fases 98:2 (Fase acuosa: Fase orgánica)	97.4:2.6
R6	Proporción de fases 98:2 (Fase acuosa: Fase orgánica)	98.6:1.4

A partir de una misma muestra adicionada de analito preparada a una concentración de 1.55 mg/mL correspondiente al 100 % de la concentración a evaluar, inyectando por triplicado para cada factor analizado, previo a la inyección de las viales preparados en cada análisis se inyecta la misma muestra de referencia que se prepara a una concentración 1.55 mg/mL:

- Calcular el promedio aritmético (\bar{x}), la desviación estándar (s) y el coeficiente de variación (CV) de los resultados de la respuesta analítica de solución de referencia obtenidos de cada factor analizado. El $CV \leq 2.0 \%$
- Calcular el promedio aritmético de los tres niveles (inferior, normal y superior) del porcentaje de recobro de los resultados del análisis de cada nivel conforme al factor seleccionado.
- Evaluar la diferencia absoluta porcentual de la media aritmética ($|d_i|$), respecto al nivel normal de cada factor seleccionado.
- Determinar si los resultados obtenidos cumplen con los siguientes criterios de aceptación:
 - $|d_i| \leq 2.0 \%$ con respecto a la condición normal

Los resultados analíticos son los siguientes:

Análisis R0 — Condición normal

Solución de referencia			Solución muestra		
Inyección	Nombre de la muestra	Área (AU)	Dato	Nombre de la muestra	Área (AU)
1	Solución referencia R0	1629418	1	Réplica 1 — R0	1661971
2	Solución referencia R0	1648871	2	Réplica 2 — R0	1651192
3	Solución referencia R0	1623655	3	Réplica 3 — R0	1638392
4	Solución referencia R0	1658443			
5	Solución referencia R0	1661169			
6	Solución referencia R0	1676651			

Análisis R1 — Modificación de longitud de onda 240 nm

Solución de referencia			Solución muestra		
Inyección	Nombre de la muestra	Área (AU)	Dato	Nombre de la muestra	Área (AU)
1	Solución referencia R1	1687276	1	Réplica 1 — R1	1692057
2	Solución referencia R1	1696863	2	Réplica 2 — R1	1715502
3	Solución referencia R1	1723444	3	Réplica 3 — R1	1728696
4	Solución referencia R1	1704160			
5	Solución referencia R1	1727015			
6	Solución referencia R1	1723138			

Análisis R2 — Modificación de longitud de onda 246 nm

Solución de referencia			Solución muestra		
Inyección	Nombre de la muestra	Área (AU)	Dato	Nombre de la muestra	Área (AU)
1	Solución referencia R2	1510056	1	Réplica 1 — R2	1515615
2	Solución referencia R2	1527059	2	Réplica 2 — R2	1508239
3	Solución referencia R2	1526836	3	Réplica 3 — R2	1541037
4	Solución referencia R2	1536672			
5	Solución referencia R2	1533987			
6	Solución referencia R2	1528053			

Análisis R3 — Modificación de velocidad de flujo 0.8 mL/min

Solución de referencia			Solución muestra		
Inyección	Nombre de la muestra	Área (AU)	Dato	Nombre de la muestra	Área (AU)
1	Solución referencia R3	1523471	1	Réplica 1 — R3	1519428
2	Solución referencia R3	1514548	2	Réplica 2 — R3	1487119
3	Solución referencia R3	1471817	3	Réplica 3 — R3	1501266
4	Solución referencia R3	1510806			
5	Solución referencia R3	1496108			
6	Solución referencia R3	1480988			

Análisis R4 — Modificación de velocidad de flujo 1.2 mL/min

Solución de referencia			Solución muestra		
Inyección	Nombre de la muestra	Área (AU)	Dato	Nombre de la muestra	Área (AU)
1	Solución referencia R4	1749537	1	Réplica 1 — R4	1718587
2	Solución referencia R4	1704031	2	Réplica 2 — R4	1757156
3	Solución referencia R4	1754973	3	Réplica 3 — R4	1729358
4	Solución referencia R4	1725018			
5	Solución referencia R4	1734488			
6	Solución referencia R4	1741793			

Análisis R5 — Modificación de proporción de fases 97.4:2.6 (Fase acuosa: Fase orgánica)

Solución de referencia			Solución muestra		
Inyección	Nombre de la muestra	Área (AU)	Dato	Nombre de la muestra	Área (AU)
1	Solución referencia R5	1521326	1	Réplica 1 — R5	1545580
2	Solución referencia R5	1526999	2	Réplica 2 — R5	1525802
3	Solución referencia R5	1530767	3	Réplica 3 — R5	1529743
4	Solución referencia R5	1506572			
5	Solución referencia R5	1510960			
6	Solución referencia R5	1525065			

Análisis R6 — Modificación de proporción de fases 98.6:1.4 (Fase acuosa: Fase orgánica)

Solución de referencia			Solución muestra		
Inyección	Nombre de la muestra	Área (AU)	Dato	Nombre de la muestra	Área (AU)
1	Solución referencia R6	1752669	1	Réplica 1 — R6	1742723
2	Solución referencia R6	1784062	2	Réplica 2 — R6	1741748
3	Solución referencia R6	1800387	3	Réplica 3 — R6	1748940
4	Solución referencia R6	1797628			
5	Solución referencia R6	1769403			
6	Solución referencia R6	1753313			

17. Se evalúan los siguientes factores: pH, temperatura de la columna y volumen de inyección. Dichos factores se fijan bajo el concepto de “cambio deliberado, pero no pequeño” respecto al nivel normal de operación indicado en el método analítico a validar, conforme se indica a continuación:

Análisis	Factor de análisis	Modificación
R0	Condición normal	Sin modificación
R1	pH 4.8	5.0
R2	pH 4.8	5.2
R3	Temperatura de la columna 20 °C	15 °C
R4	Temperatura de la columna 20 °C	25 °C
R5	Volumen de inyección 30 µL	25 µL
R6	Volumen de inyección 30 µL	30 µL

A partir de una misma muestra adicionada de analito preparada a una concentración de 2.70 mg/mL correspondiente al 100 % de la concentración a evaluar, se inyecta por triplicado para cada factor analizado. Previo a la inyección de las viales preparados en cada análisis, se verifica que se cumplan los criterios aceptación dados en la Verificación del sistema — Aptitud del sistema ($CV \leq 2.0 \%$) de una solución de referencia de concentración 2.70 mg/mL.

- Calcular el promedio aritmético de los tres niveles (inferior, normal y superior) del porcentaje de recobro de los resultados del análisis de cada nivel conforme al factor seleccionado.
- Evaluar la diferencia absoluta porcentual de la media aritmética ($|d_i|$), respecto al nivel normal de cada factor seleccionado.
- Determinar si los resultados obtenidos cumplen con los siguientes criterios de aceptación:
 - $|d_i| \leq 2.0\%$ con respecto a la condición normal

Los resultados analíticos obtenidos son los siguientes:

Análisis R0 — Condición normal

Solución de referencia			643087
Solución muestra			
Dato	Nombre de la muestra	Área (AU)	
1	Réplica 1 — R0	645014	
2	Réplica 2 — R0	647099	
3	Réplica 3 — R0	646141	

Análisis R2 — Modificación de velocidad de flujo 1.2 mL/min

Solución de referencia			559012
Solución muestra			
Dato	Nombre de la muestra	Área (AU)	
1	Réplica 1 — R2	569842	
2	Réplica 2 — R2	565849	
3	Réplica 3 — R2	566590	

Análisis R4 — Modificación de pH 5.6

Solución de referencia			636296
Solución muestra			
Dato	Nombre de la muestra	Área (AU)	
1	Réplica 1 — R4	657041	
2	Réplica 2 — R4	654600	
3	Réplica 3 — R4	652030	

Análisis R1 — Modificación de velocidad de flujo 0.8 mL/min

Solución de referencia			704023
Solución muestra			
Dato	Nombre de la muestra	Área (AU)	
1	Réplica 1 — R1	705486	
2	Réplica 2 — R1	706854	
3	Réplica 3 — R1	707266	

Análisis R3 — Modificación de pH 5.2

Solución de referencia			681048
Solución muestra			
Dato	Nombre de la muestra	Área (AU)	
1	Réplica 1 — R3	624809	
2	Réplica 2 — R3	621825	
3	Réplica 3 — R3	627646	

Análisis R5 — Modificación de temperatura de columna 35 °C

Solución de referencia			614511
Solución muestra			
Dato	Nombre de la muestra	Área (AU)	
1	Réplica 1 — R5	575376	
2	Réplica 2 — R5	568485	
3	Réplica 3 — R5	572263	

Análisis R6 — Modificación de temperatura de columna 25 °C

Solución de referencia		555062
Solución muestra		
Dato	Nombre de la muestra	Área (AU)
1	Réplica 1 — R6	533294
2	Réplica 2 — R6	530273
3	Réplica 3 — R6	532939

Desarrollo por determinación de la investigación de cuatro a siete factores.

18. Se emplea una misma muestra adicionada de analito preparada a una concentración de 3.52 mg/mL correspondiente al 100 % de la concentración a evaluar, inyectando por triplicado para cada factor analizado: Previo a la inyección de las viales preparados para cada corrida analítica, se verifica que se cumplan los criterios aceptación dados en la Verificación del sistema — Aptitud del sistema ($CV \leq 2.0\%$) de una solución de referencia de concentración 2.70 mg/mL. El promedio de los resultados de la respuesta (y) para corrida analítica son: 246251, 239415, 264496, 207493, 168730, 271337, 218893, 180131 respectivamente para la corrida analítica 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8.
- Seguir el procedimiento del diseño experimental de Placket Burman para 8 corridas con sus correspondientes tablas descriptivas.
 - Realizar la conclusión respecto a la robustez del método analítico.

a) Selección de factores

Tabla R1. Factores reales y no reales

Letra	Factor
A	Proporción de fases
B	pH
C	Longitud de onda
D	Velocidad de flujo
E	Factor falso
F	Temperatura de la columna
G	Factor falso

b) Elección de los niveles de cada factor

Tabla R2. Elección de niveles de cada factor

Letra	Factor	Nivel		
		Bajo (-)	Normal	Alto (+)
A	Proporción de fases	58.5:35:6.5	60:35:5 (Buffer:MeOH:THF)	61.5:35:3.5
B	pH	4.4	4.8	5.2
C	Longitud de onda	271	274 nm	277
D	Velocidad de flujo	0.4	0.6 mL/min	0.8
F	Temperatura de la columna	20 °C	25 °C	30 °C

Límite de detección

19. Se prepara por triplicado una solución de referencia a una concentración de 34 ppm a partir de pesadas independientes. De cada solución de referencia preparada se toma una serie alícuotas para preparar una curva de calibración (CC) con soluciones al 2.72, 4.08, 5.44, 6.80 y 8.16 ppm correspondientes al 40, 60, 80, 100 y 120% respectivamente a la concentración del analito a evaluar. La especificación límite es de 6.8 ppm
- Reportar la relación de concentración (x) vs respuesta analítica (y).
 - Calcular el valor de la pendiente (b), la ordenada al origen (a), coeficiente de determinación (r^2) y el intervalo de confianza para la pendiente $IC(\beta_1)$.
 - Estimar el límite de detección (LD).
 - Determinar si los resultados obtenidos cumplen con los siguientes criterios de aceptación:
 - $r^2 = \geq 0.98$.
 - $IC(\beta_1)$ no debe incluir el cero.
 - El LD debe ser menor a la especificación de la prueba de impurezas límite.

Los resultados analíticos obtenidos son los siguientes:

LINEALIDAD DEL LD

Inyección	Nombre de la muestra	Concentración (ppm) (x)	Área (AU) (y)
1	Solución referencia 40% - CC 1	2.72	13458
2	Solución referencia 40% - CC 2	2.72	13563
3	Solución referencia 40% - CC 3	2.72	13294
4	Solución referencia 60% - CC 1	4.08	20190
5	Solución referencia 60% - CC 2	4.08	19900
6	Solución referencia 60% - CC 3	4.08	19932
7	Solución referencia 80% - CC 1	5.44	27030
8	Solución referencia 80% - CC 2	5.44	27335
9	Solución referencia 80% - CC 3	5.44	27182
10	Solución referencia 100% - CC 1	6.80	33425
11	Solución referencia 100% - CC 2	6.80	34137
12	Solución referencia 100% - CC 3	6.80	33465
13	Solución referencia 120% - CC 1	8.16	40992
14	Solución referencia 120% - CC 2	8.16	40390
15	Solución referencia 120% - CC 3	8.16	40080

20. Se prepara por triplicado una solución de referencia a una concentración de 28.8 ppm a partir de pesadas independientes. De cada solución de referencia preparada se toma una serie alícuotas para preparar una curva de calibración (CC) con soluciones al 2.88, 4.32, 5.76, 7.20 y 8.64ppm correspondientes al 40, 60, 80, 100 y 120% respectivamente a la concentración del analito a evaluar. La especificación límite es de 7.2 ppm

- a. Reportar la relación de concentración (x) vs respuesta analítica (y).
- b. Calcular el valor de la pendiente (b), la ordenada al origen (a), coeficiente de determinación (r^2) y el intervalo de confianza para la pendiente $IC(\beta_1)$.
- c. Estimar el límite de detección (LD).
- d. Determinar si los resultados obtenidos cumplen con los siguientes criterios de aceptación:
 - $r^2 = \geq 0.98$.
 - $IC(\beta_1)$ no debe incluir el cero.
 - El LD debe ser menor a la especificación de la prueba de impurezas límite.

Los resultados analíticos obtenidos son los siguientes:

LINEALIDAD DEL LD

Inyección	Nombre de la muestra	Concentración (ppm) (x)	Área (AU) (y)
1	Solución referencia 40% - CC 1	2.88	36318
2	Solución referencia 40% - CC 2	2.88	37489
3	Solución referencia 40% - CC 3	2.88	36059
4	Solución referencia 60% - CC 1	4.32	55379
5	Solución referencia 60% - CC 2	4.32	53786
6	Solución referencia 60% - CC 3	4.32	54313
7	Solución referencia 80% - CC 1	5.76	71622
8	Solución referencia 80% - CC 2	5.76	72417
9	Solución referencia 80% - CC 3	5.76	72743
10	Solución referencia 100% - CC 1	7.20	92256
11	Solución referencia 100% - CC 2	7.20	93350
12	Solución referencia 100% - CC 3	7.20	94014
13	Solución referencia 120% - CC 1	8.64	106040
14	Solución referencia 120% - CC 2	8.64	108223
15	Solución referencia 120% - CC 3	8.64	107243

Límite de cuantificación

21. Se prepara por triplicado una solución de referencia a una concentración de 18.8 ppm a partir de pesadas independientes. De cada solución de referencia preparada se toma una serie alícuotas para preparar una curva de calibración (CC) con soluciones al 1.504, 2.256, 3.008, 3.760 y 4.512 $\mu\text{g/mL}$ correspondientes al 40, 60, 80, 100 y 120% respectivamente a la concentración del analito a evaluar. La especificación límite es de 3.76 $\mu\text{g/mL}$.
- Reportar la relación de concentración (x) vs respuesta analítica (y).
 - Calcular el valor de la pendiente (b), la ordenada al origen (a), coeficiente de determinación (r^2) y el intervalo de confianza para la pendiente $IC(\beta_1)$.
 - Estimar el límite de cuantificación (LC).
 - Determinar si los resultados obtenidos cumplen con los siguientes criterios de aceptación:
 - $r^2 = \geq 0.98$.
 - $IC(\beta_1)$ no debe incluir el cero.
 - El LC debe ser menor a la especificación de valoración de la prueba de impurezas.

Los resultados analíticos obtenidos son los siguientes:

LINEALIDAD DEL LC

Inyección	Nombre de la muestra	Concentración ($\mu\text{g/mL}$) (x)	Área (AU) (y)
1	Solución referencia 40% - CC 1	1.504	20383
2	Solución referencia 40% - CC 2	1.504	20833
3	Solución referencia 40% - CC 3	1.504	21059
4	Solución referencia 60% - CC 1	2.256	30280
5	Solución referencia 60% - CC 2	2.256	31541
6	Solución referencia 60% - CC 3	2.256	30642
7	Solución referencia 80% - CC 1	3.008	41589
8	Solución referencia 80% - CC 2	3.008	40935
9	Solución referencia 80% - CC 3	3.008	40954
10	Solución referencia 100% - CC 1	3.760	52120
11	Solución referencia 100% - CC 2	3.760	51748
12	Solución referencia 100% - CC 3	3.760	51984
13	Solución referencia 120% - CC 1	4.512	60656
14	Solución referencia 120% - CC 2	4.512	61774
15	Solución referencia 120% - CC 3	4.512	62813

22. Se prepara por triplicado una solución de referencia a una concentración de 22.40 ppm a partir de pesadas independientes. De cada solución de referencia preparada se toma una serie alícuotas para preparar una curva de calibración (CC) con soluciones al 2.24, 3.36, 4.48, 5.60 y 6.72ppm correspondientes al 40, 60, 80, 100 y 120% respectivamente a la concentración del analito a evaluar. La especificación límite es de 5.60 ppm.

- a. Reportar la relación de concentración (x) vs respuesta analítica (y).
- b. Calcular el valor de la pendiente (b), la ordenada al origen (a), coeficiente de determinación (r^2) y el intervalo de confianza para la pendiente $IC(\beta_1)$.
- c. Estimar el límite de cuantificación (LC).
- d. Determinar si los resultados obtenidos cumplen con los siguientes criterios de aceptación:
 - $r^2 = \geq 0.98$.
 - $IC(\beta_1)$ no debe incluir el cero.
 - El LC debe ser menor a la especificación de valoración de la prueba de impurezas.

Los resultados analíticos obtenidos son los siguientes:

LINEALIDAD DEL LC

Inyección	Nombre de la muestra	Concentración (ppm) (x)	Área (AU) (y)
1	Solución referencia 40% - CC 1	2.24	31763
2	Solución referencia 40% - CC 2	2.24	31271
3	Solución referencia 40% - CC 3	2.24	31092
4	Solución referencia 60% - CC 1	3.36	47536
5	Solución referencia 60% - CC 2	3.36	47586
6	Solución referencia 60% - CC 3	3.36	47831
7	Solución referencia 80% - CC 1	4.48	64163
8	Solución referencia 80% - CC 2	4.48	63050
9	Solución referencia 80% - CC 3	4.48	63189
10	Solución referencia 100% - CC 1	5.60	78442
11	Solución referencia 100% - CC 2	5.60	80250
12	Solución referencia 100% - CC 3	5.60	77870
13	Solución referencia 120% - CC 1	6.72	95799
14	Solución referencia 120% - CC 2	6.72	94740
15	Solución referencia 120% - CC 3	6.72	94308

Apéndices

Apéndice 1. Tabla A. Fórmulas estadísticas

Tabla A. Fórmulas estadísticas [3, 5, 9]

<p style="text-align: center;">Porcentaje de recobro</p> $\%R = \frac{[C_{RE}]}{[C_{AD}]} \times 100 \%$ <p>Donde: <i>% R = Porcentaje de recobro</i> <i>[C_{AD}] = Concentración adicionada.</i> <i>[C_{RE}] = Concentración recuperada.</i></p>	<p style="text-align: center;">Concentración recuperada</p> $[C_{RE}] = \frac{\text{Área mta} \times [STD]}{\text{Área } \bar{x} \text{ STD}}$ <p>Donde: <i>[C_{RE}] = Concentración recuperada.</i> <i>Área mta = Área de la solución muestra</i> <i>[STD] = Concentración de la solución de referencia.</i> <i>Área \bar{x} STD = Área promedio de la solución de referencia.</i></p>
<p style="text-align: center;">Promedio aritmético</p> $\bar{x} = \frac{\sum x}{n}$ <p>Donde: <i>\bar{x} = Promedio aritmético.</i> <i>$\sum x$ = Sumatoria de valores de x.</i> <i>n = Número de muestras.</i></p>	<p style="text-align: center;">Coefficiente de variación</p> $CV = \frac{s}{\bar{x}} \times 100$ <p>Donde: <i>CV = Desviación estándar relativa o CV.</i> <i>s = Desviación estándar.</i> <i>\bar{x} = Promedio aritmético.</i></p>
<p style="text-align: center;">Coefficiente de variación de regresión</p> $CV_{y/x} = \frac{s_{y/x}}{\bar{x}} \times 100$ <p>Donde: <i>CV_{y/x} = Coeficiente de variación de regresión.</i> <i>s_{y/x} = Desviación estándar de la regresión.</i> <i>\bar{x} = Promedio aritmético.</i></p>	<p style="text-align: center;">Coefficiente de determinación</p> $r^2 = \frac{[n(\sum xy) - (\sum x)(\sum y)]^2}{[n(\sum x^2) - (\sum x)^2][n(\sum y^2) - (\sum y)^2]}$ <p>Donde: <i>r² = Coeficiente de determinación.</i> <i>$\sum xy$ = Sumatoria del producto de los valores de x & y.</i> <i>$\sum x$ = Sumatoria de valores de x.</i> <i>$\sum y$ = Sumatoria de valores de y.</i> <i>$\sum x^2$ = Sumatoria de los valores de x al cuadrado.</i> <i>$\sum y^2$ = Sumatoria de los valores de y al cuadrado.</i> <i>n = Número de muestras.</i></p>
<p style="text-align: center;">Desviación estándar</p> $s = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{(n - 1)}}$ <p>Donde: <i>s = Desviación estándar.</i> <i>$\sum (x - \bar{x})^2$ = Sumatoria de la resta de valores de x menos el promedio aritmético elevado al cuadrado.</i> <i>x = Valor individual.</i> <i>\bar{x} = Promedio aritmético.</i> <i>n = Número de muestras.</i></p>	

Tabla A. Fórmulas estadísticas [3, 5, 9]

<p>Desviación estándar de la ordenada al origen</p> $S_a = s_{y/x} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{(\bar{x})^2}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}$ <p>Donde: <i>s_a</i> = Desviación estándar de la ordenada al origen. <i>s_{y/x}</i> = Desviación estándar de la regresión. \bar{x} = Media aritmética. $\sum x$ = Sumatoria de valores de x. $\sum x^2$ = Sumatoria de los valores de x al cuadrado. <i>n</i> = Número de muestras.</p>	<p>Desviación estándar de la pendiente</p> $sb_1 = s_{y/x} \sqrt{\frac{1}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}$ <p>Donde: <i>sb₁</i> = Desviación estándar de la pendiente. <i>s_{y/x}</i> = Desviación estándar de la regresión. $\sum x$ = Sumatoria de valores de x. $\sum x^2$ = Sumatoria de los valores de x al cuadrado. <i>n</i> = Número de muestras.</p>
<p>Desviación estándar de la regresión</p> $s_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum y^2 - b \sum xy - a \sum y}{n - 2}}$ <p>Donde: <i>s_{y/x}</i> = Desviación estándar de la regresión. <i>b</i> = Pendiente. <i>a</i> = Ordenada al origen. $\sum xy$ = Sumatoria del producto de los valores de x & y. $\sum y$ = Sumatoria de valores de y. $\sum y^2$ = Sumatoria de los valores de y al cuadrado. <i>n</i> = Número de muestras.</p>	<p>Intervalo de confianza para la media poblacional</p> $IC(\mu) = \bar{x} \pm t_{(0.975, n-1)} \times \frac{s}{\sqrt{n}}$ <p>Donde: <i>IC</i> = Intervalo de confianza para la media poblacional. \bar{x} = Promedio aritmético. <i>t</i> = Valor referente a la tabla de t student. <i>n</i> = Número de muestras. <i>s</i> = Desviación estándar.</p>
<p>Intervalo de confianza para la pendiente</p> $IC(\beta_1) = b \pm t_{(0.975, n-2)} \times sb_1$ <p>Donde: <i>IC(β₁)</i> = Intervalo de confianza de la pendiente <i>b</i> = Pendiente. <i>t</i> = Valor referente a la tabla de t student. <i>n</i> = Número de muestras. <i>sb₁</i> = Desviación estándar de la pendiente</p>	<p>Intervalo de confianza para la ordenada al origen</p> $IC(\beta_0) = a \pm t_{(0.975, n-2)} \times s_a$ <p>Donde: <i>IC(β₀)</i> = Intervalo de confianza de la ordenada al origen <i>a</i> = Ordenada al origen <i>t</i> = Valor referente a la tabla de t student. <i>n</i> = Número de muestras. <i>s_a</i> = Desviación estándar de la ordenada al origen.</p>

Tabla A. Fórmulas estadísticas [3, 5, 9]

Límite de cuantificación	Límite de detección
$LC = \frac{10 \times s_e}{b}$	$LD = \frac{10 \times s_e}{b}$
<p><i>LC = Límite de cuantificación.</i> <i>b = Pendiente.</i> <i>s_e = Medida de error de la respuesta analítica, (s_w, s_{y/x}, s_a) por tanto:</i></p>	<p><i>LD = Límite de detección.</i> <i>b = Pendiente.</i> <i>s_e = Medida de error de la respuesta analítica, (s_w, s_{y/x}, s_a) por tanto:</i></p>
<p><i>s_w = Desviación estándar de blancos o matrices analíticas no adicionadas de analito.</i></p>	<p><i>s_w = Desviación estándar de blancos o matrices analíticas no adicionadas de analito.</i></p>
$LD = \frac{10 \times s_w}{b}$	$LD = \frac{3.3 \times s_w}{b}$
<p><i>s_{y/x} = Desviación estándar de la regresión.</i></p>	<p><i>s_{y/x} = Desviación estándar de la regresión.</i></p>
$LC = \frac{10 \times s_{y/x}}{b}$	$LD = \frac{3.3 \times s_{y/x}}{b}$
<p><i>s_a = Desviación estándar de la ordenada al origen.</i></p>	<p><i>s_a = Desviación estándar de la ordenada al origen.</i></p>
$LC = \frac{10 \times s_a}{b}$	$LD = \frac{3.3 \times s_a}{b}$
Ordenada al origen	Pendiente
$a = \frac{\sum y - b \sum x}{n}$	$b = \frac{n \sum xy + \sum x \sum y}{n \sum x^2 - (\sum x)^2}$
<p>Donde: <i>a = Ordenada al origen.</i> <i>∑x = Sumatoria de valores de x.</i> <i>∑y = Sumatoria de valores de y.</i> <i>b = Pendiente</i> <i>n = Número de muestras.</i></p>	<p>Donde: <i>b = Pendiente.</i> <i>∑xy = Sumatoria del producto de los valores de x & y.</i> <i>∑x = Sumatoria de valores de x.</i> <i>∑y = Sumatoria de valores de y.</i> <i>∑x² = Sumatoria de los valores de x al cuadrado.</i> <i>n = Número de muestras.</i></p>

Apéndice 2. Tabla B. Valores críticos de la distribución con $\alpha = 0.05$

*Tabla B. Valores críticos de la distribución con $\alpha = 0.05$
Valores t_{tab} , F_{tab} , ($F_1 = F_1, gl_e$; $F_2 = F_2, gl_e$; $F_3 = F_3, gl_e$) y X^2_{tab} ^[7]*

gl_e	t_{tab}	F_1	F_2	F_3	X^2_{tab}
1	12.706	161.446	199.499	215.707	3.841
2	4.303	18.513	19.000	19.164	5.991
3	3.182	10.128	9.552	9.277	7.815
4	2.776	7.709	6.994	6.951	9.488
5	2.571	6.608	5.786	5.409	11.070
6	2.447	5.987	5.143	4.757	12.592
7	2.365	5.591	4.737	4.347	14.067
8	2.306	5.318	4.459	4.066	15.507
9	2.262	5.117	4.256	3.863	16.919
10	2.228	4.965	4.103	3.708	18.307
11	2.201	4.844	3.982	3.587	19.675
12	2.179	4.747	3.885	3.490	21.026
13	2.160	4.667	3.806	3.411	22.362
14	2.145	4.600	3.739	3.344	23.685
15	2.131	4.543	3.682	3.287	24.996
16	2.120	4.494	3.634	3.239	26.296
17	2.110	4.451	3.592	3.197	27.587
18	2.101	4.414	3.555	3.160	28.869
19	2.093	4.381	3.522	3.127	30.144
20	2.086	4.351	3.493	3.098	31.410
21	2.080	4.325	3.467	3.072	32.671
22	2.074	4.301	3.443	3.049	33.924
23	2.069	4.279	3.422	3.028	35.172
24	2.064	4.260	3.403	3.009	36.415
25	2.060	4.242	3.385	2.991	37.652
26	2.056	4.225	3.369	2.975	38.885
27	2.052	4.210	3.354	2.960	40.113
28	2.048	4.196	3.340	2.947	41.337
29	2.045	4.183	3.328	2.934	42.557
30	2.042	4.171	3.316	2.922	43.773
40	2.021	4.085	3.232	2.839	55.758
60	2.000	4.001	3.150	2.758	79.082
120	1.980	3.920	3.072	2.680	146.567
∞	1.972	3.888	3.041	2.650	233.994

Nota: el valor de la t_{tab} está referido a intervalo de confianza bilaterales al 95 %.

El subíndice numérico de F indica los grados de libertad del numerador y gl_e indica los grados de libertad del denominador (error).

Apéndice 3. Tabla C. Estadística de la distribución t de Student*Tabla C. Estadística de la distribución t de student* ^[3]

GRADOS DE LIBERTAD	t _{0.975}	GRADOS DE LIBERTAD	t _{0.975}	GRADOS DE LIBERTAD	t _{0.975}
1	12.706	26	2.056	51	2.008
2	4.303	27	2.052	52	2.007
3	3.182	28	2.048	53	2.006
4	2.776	29	2.045	54	2.005
5	2.571	30	2.042	55	2.004
6	2.447	31	2.040	56	2.003
7	2.365	32	2.037	57	2.002
8	2.306	33	2.035	58	2.002
9	2.262	34	2.032	59	2.001
10	2.228	35	2.030	60	2.000
11	2.201	36	2.028	61	2.000
12	2.179	37	2.026	62	1.999
13	2.160	38	2.024	63	1.998
14	2.145	39	2.023	64	1.998
15	2.131	40	2.021	65	1.997
16	2.120	41	2.020	66	1.997
17	2.110	42	2.018	67	1.996
18	2.101	43	2.017	68	1.995
19	2.093	44	2.015	69	1.995
20	2.086	45	2.014	70	1.994
21	2.080	46	2.013	71	1.994
22	2.074	47	2.012	72	1.993
23	2.069	48	2.011	73	1.993
24	2.064	49	2.010	74	1.993
25	2.060	50	2.009	75	1.992

Los grados de libertad (gl) se fijan con base a la fórmula indicada en el subíndice del símbolo de la t de Student.

Apéndice 4. Uso del análisis de datos para Excel 365

A continuación, se describe el empleo de la función “Análisis de datos de Excel 365”, para obtener valores de medidas estadísticas, de las cuales se describen para determinar los cálculos de ANOVA de un solo factor, así como la descripción para obtener un resultado los diferentes intervalos de confianza. empleados en las diferentes características de desempeño del presente manual.

Activación de la Herramienta de análisis de datos

1. Hacer clic en la pestaña **Archivo**, elegir **Opciones** y después hacer clic en la categoría **Complementos**
2. En el cuadro **Administrar**, seleccionar **Complementos de Excel** y después hacer clic en **Ir**.
3. En el cuadro **Complementos**, activar la casilla **Herramientas para análisis** y después hacer clic en **Aceptar**.

Instrucciones de uso para ANOVA de un factor

1. Hacer clic en la pestaña **Datos**, seleccionar **Análisis de datos** en la sección **Análisis**.
2. En el cuadro **Análisis de datos** seleccionar **Análisis de varianza de un factor** y después hacer clic en **Aceptar**.
3. En el cuadro **Análisis de varianza de un factor**, indicar en el campo **Entrada** para el **Rango de entrada** las celdas donde previamente se descargan los datos de interés obtenidos (porcentaje recuperado), seleccionar **Columnas o filas**, conforme se hayan agrupado los datos, se recomienda colocar un valor de significancia (α) de 0.05 en **Alfa**.
4. Indicar en el campo **Opciones de salida** la celda donde se desplegará el Análisis de varianza de un factor.
5. Hacer clic en **Aceptar**.
6. Se desplegarán los resultados del **Análisis de varianza de un factor**, de forma opcional, dar nombre a las variables desplegadas de acuerdo con lo solicitado en el método analítico.

Instrucciones de uso de Regresión

1. Hacer clic en la pestaña **Datos**, seleccionar **Análisis de datos** en la sección **Análisis**.
2. En el cuadro **Análisis de datos** seleccionar **Regresión** y después hacer clic en **Aceptar**.
3. En el cuadro **Regresión** indicar en el campo **Entrada** para el **Rango Y de entrada** las celdas donde previamente se descargaron los datos de interés obtenidos (respuesta analítica y/o porcentaje recuperado), para el **Rango de entrada X** las celdas donde previamente se descargaron los datos de concentración, activar la casilla **Nivel de confianza**, se recomienda colocar un valor de 95%.
4. Indicar en el campo **Opciones de salida** la celda donde se desplegará la Regresión.
5. Activas las casillas requeridas de los campos **Residuales** y **Probabilidad normal**.
6. Hacer clic en **Aceptar**.
7. Se desplegarán los resultados de la **Regresión**, de forma opcional, dar nombre a las variables gráficos desplegados según apliquen, de acuerdo con lo solicitado en el método analítico.

Apéndice 5. Resultados de los ejercicios prácticos

Verificación del sistema (Aptitud del sistema)

1. Ejercicio 1.

Criterio de aceptación	Resultados Analito A		Conclusión
	Analista 1	Analista 2	
$CV \leq 2.0 \%$	$CV = 3.8 \%$	$CV = 3.2 \%$	No Cumple
Platos teóricos (N) ≥ 2000	$N = 1968$	$N = 1983$	No Cumple

Criterio de aceptación	Resultados Analito B		Conclusión
	Analista 1	Analista 2	
$CV \leq 2.0 \%$	$CV = 0.5 \%$	$CV = 0.7 \%$	Cumple
Platos teóricos (N) ≥ 2000	$N = 6174$	$N = 6130$	Cumple
Resolución (R) ≥ 2000	$R = 4.8$	$R = 4.8$	Cumple

Precisión del sistema

2. Ejercicio 2.

Criterio de aceptación	Resultado	Conclusión
$CV \leq 1.5 \%$	$CV = 0.3 \%$	Cumple

Linealidad del sistema

3. Ejercicio 3.

Criterio de aceptación	Resultado	Conclusión
$r^2 \geq 0.98$	$r^2 = 0.9996$	Cumple
$IC(\beta_1)$ no debe incluir el cero	$IC(\beta_1) = 820732.3 - 1074036.7$, no incluye el cero	Cumple

4. Ejercicio 4.

Criterio de aceptación	Resultado	Conclusión
$r^2 \geq 0.98$	$r^2 = 0.9972$	Cumple
$IC(\beta_1)$ no debe incluir el cero	$IC(\beta_1) = 1321718.4 - 1408590.4$, no incluye el cero	Cumple

Especificidad

5. Ejercicio 5

Respuesta. A partir de los datos obtenidos de las dos eluciones se elige el gradiente con el cual se consiguió resolver todos los picos en 38 min, mientras que para la elución isocrática se separan todos los picos en poco más de 2 horas, este dejó de ser útil porque tarda demasiado tiempo, a pesar de que ambas eluciones presentan una adecuada identificación de picos.

Estabilidad analítica6. *Ejercicio 6.*

Criterio de aceptación	Resultado	Conclusión
d _i ≤ 2.0 % de cada tiempo respecto al análisis inicial	d ₁ = 0.1 % para 12 horas	Cumple
	d ₂ = 0.5 % para 24 horas	Cumple
	d ₃ = 2.4 % para 48 horas	No cumple

7. *Ejercicio 7.*

Criterio de aceptación	Resultado	Conclusión
d _i ≤ 2.0 % de cada tiempo respecto al análisis inicial	d ₁ = 0.0 % para 6 horas	Cumple
	d ₂ = 0.7 % para 12 horas	Cumple
	d ₃ = 0.8 % para 24 horas	Cumple

Exactitud del método8. *Ejercicio 8.*

Criterio de aceptación	Resultado	Conclusión
CV del porcentaje de recobro no mayor a 2.0 %	CV = 0.5 %	Cumple
El IC(μ) debe incluir el 100% o que el promedio aritmético del porcentaje de recobro se incluya en el intervalo: 98.0 % — 102.0 %	IC(μ) = 99.4%—100.4%	Cumple

9. *Ejercicio 9.*

Criterio de aceptación	Resultado	Conclusión
CV del porcentaje de recobro no mayor a 2.0 %	CV = 0.4 %	Cumple
El IC(μ) debe incluir el 100% o que el promedio aritmético del porcentaje de recobro se incluya en el intervalo: 98.0 % — 102.0 %	IC(μ) = 101.3%—102.2%	No cumple

Linealidad e intervalo del método10. *Ejercicio 10.*

Criterio de aceptación	Resultado de concentración adicionada vs concentración recuperada	Conclusión
$r^2 \geq 0.98$	$r^2 \geq 0.9946$	Cumple
IC (β ₁) debe incluir la unidad	IC(β ₁) = 0.9403 — 1.0769, incluye la unidad	Cumple
IC(β ₀) debe incluir el cero	IC(β ₀) = -0.2110 — 0.1566, incluye el cero	Cumple
CV _{y/x} del porcentaje de recobro no debe ser mayor a 2.0 %	CV _{y/x} = 1.4 %	Cumple

Criterio de aceptación	Resultado del porcentaje de recobro	Conclusión
El CV del porcentaje de recobro no debe ser mayor 2.0 %	CV = 1.3 %	Cumple
El IC(μ) debe incluir el 100% o que el promedio aritmético del porcentaje de recobro se incluya en el intervalo de 98.0 % - 102.0 %	IC(μ) = 98.8 % — 100.8	Cumple

11. Ejercicio 11.

Criterio de aceptación	Resultado de concentración adicionada vs concentración recuperada	Conclusión
$r^2 \geq 0.98$	$r^2 \geq 0.9820$	Cumple
IC (β_1) debe incluir la unidad	IC(β_1) = 0.8085 — 1.0465, incluye la unidad	Cumple
IC(β_0) debe incluir el cero	IC(β_0) = -0.0456 — 0.1544, incluye el cero	Cumple
CV _{y/x} del porcentaje de recobro no debe ser mayor a 2.0 %	CV _{y/x} = 2.5 %	No cumple

Criterio de aceptación	Resultado del porcentaje de recobro	Conclusión
El CV del porcentaje de recobro no debe ser mayor 2.0 %	CV = 2.5 %	No cumple
El IC(μ) debe incluir el 100% o que el promedio aritmético del porcentaje de recobro se incluya en el intervalo de 98.0 % - 102.0 %	IC(μ) = 97.7 % — 101.5	No cumple

Precisión del método

12. Ejercicio 12.

Criterio de aceptación	Resultado	Conclusión
Para la Repetibilidad el CV ≤ 2 %	CV = 0.5 %	Cumple
Para la Reproducibilidad Intralaboratorio (Precisión intermedia) el CV ≤ 2 %	CV = 0.6 %	Cumple

13. Ejercicio 13.

Criterio de aceptación	Resultado	Conclusión
Para la Repetibilidad: CV del porcentaje de recobro ≤ 2 %	CV = 1.0 %	Cumple
CV y/x de la relación concentración recuperada contra concentración adicionada ≤ 2 %	CV y/x = 1.0 %	
Para la Reproducibilidad Intralaboratorio (Precisión intermedia) el CV ≤ 2 %	CV = 0.6 %	Cumple

Resultados adicionales de linealidad

Criterio de aceptación	Resultado de concentración adicionada vs concentración recuperada	Conclusión
$r^2 \geq 0.98$	$r^2 \geq 0.9984$	Cumple
IC (β_1) debe incluir la unidad	IC(β_1) = 0.9883 — 1.0839, incluye la unidad	Cumple
IC(β_0) debe incluir el cero	IC(β_0) = -0.0944 — 0.0220, incluye el cero	Cumple

Criterio de aceptación	Resultado del porcentaje de recobro	Conclusión
El IC(μ) debe incluir el 100% o que el promedio aritmético del porcentaje de recobro se incluya en el intervalo de 98.0 % - 102.0 %	IC(μ) = 99.7 % — 101.3	No cumple

Tolerancia del método

14. Ejercicio 14.

Criterio de aceptación	Resultado	Conclusión
CV del porcentaje de recobro no mayor a 2.0 %	CV = 0.9 %	Cumple

15. Ejercicio 15.

Criterio de aceptación	Resultado	Conclusión
CV del porcentaje de recobro no mayor a 2.0 %	CV = 0.4 %	Cumple

Robustez del método

16. Ejercicio 16.

Criterio de aceptación	Resultado	Conclusión
$ di \leq 2.0$ % con respecto a la condición normal	La $ di $ de la condición R1 es igual a 0.4 con respecto a la condición normal	Cumple
	La $ di $ de la condición R2 es igual a 0.4 con respecto a la condición normal	Cumple
	La $ di $ de la condición R3 es igual a 0.2 con respecto a la condición normal	Cumple
	La $ di $ de la condición R4 es igual a 0.0 con respecto a la condición normal	Cumple
	La $ di $ de la condición R5 es igual a 0.8 con respecto a la condición normal	Cumple
	La $ di $ de la condición R6 es igual a 1.8 con respecto a la condición normal	Cumple

17. Ejercicio 17.

Criterio de aceptación	Resultado	Conclusión
di ≤ 2.0 % con respecto a la condición normal	La di de la condición R1 es igual a 0.1 con respecto a la condición normal	Cumple
	La di de la condición R2 es igual a 1.0 con respecto a la condición normal	Cumple
	La di de la condición R3 es igual a 9.0 con respecto a la condición normal	No cumple
	La di de la condición R4 es igual a 2.4 con respecto a la condición normal	No cumple
	La di de la condición R5 es igual a 7.4 con respecto a la condición normal	No cumple
	La di de la condición R6 es igual a 4.6 con respecto a la condición normal	No cumple

18. Ejercicio 18.

Conclusión respecto a la robustez del método analítico

Factor	Conclusión
Proporción de fases	El método analítico es robusto en el intervalo 60:35:5 (Buffer:MeOH:THF) con modificación de 2.5% para el primer componente y 30% para el tercer componente
pH	El método analítico no es robusto, por lo tanto, el intervalo debe ser con un pH 4.8.
Longitud de onda	El método es robusto en el intervalo 274 ± 3,
Velocidad de flujo	El método analítico es robusto en el intervalo 0.6 mL/min ± 0.2.
Temperatura de la columna	El método analítico no es robusto, por lo tanto, la temperatura de la columna debe ser de 25 °C.

Límite de detección

19. Ejercicio 19.

Criterio de aceptación	Resultado de linealidad	Conclusión
$r^2 \geq 0.98$	$r^2 \geq 0.9992$	Cumple
IC (β_1) debe incluir la unidad	IC (β_1) = 4895.7 — 5069.9	Cumple
El LD debe ser menor a la especificación 6.8 ppm	LD S y/x = 0.1990 ppm	El LD calculado es menor a la especificación límite evaluada 6.8 ppm

20. Ejercicio 20.

Criterio de aceptación	Resultado de linealidad	Conclusión
$r^2 \geq 0.98$	$r^2 \geq 0.9965$	Cumple
IC (β_1) debe incluir la unidad	IC (β_1) = 12044.9 — 12928.3	Cumple
El LD debe ser menor a la especificación 7.2 ppm	LD Sa = 0.3302 ppm	El LD calculado es menor a la especificación límite evaluada de 7.2 ppm

Límite de cuantificación

21. Ejercicio 21.

Criterio de aceptación	Resultado de linealidad	Conclusión
$r^2 \geq 0.98$	$r^2 \geq 0.9986$	Cumple
IC (β_1) debe incluir la unidad	IC (β_1) = 13407.4 — 14015.0	Cumple
El LC debe ser menor a la especificación 3.76 $\mu\text{g/mL}$	LC S y/x = 0.4225 $\mu\text{g/mL}$	El LD calculado es menor a la especificación límite evaluada de 3.76 $\mu\text{g/mL}$

22. Ejercicio 22.

Criterio de aceptación	Resultado de linealidad	Conclusión
$r^2 \geq 0.98$	$r^2 \geq 0.9992$	Cumple
IC (β_1) debe incluir la unidad	IC (β_1) = 13899.3 — 14377.5	Cumple
El LC debe ser menor a la especificación 5.6 ppm	LC S y/x = 0.3720 ppm	El LD calculado es menor a la especificación límite evaluada de 5.6 ppm

6. METODOLOGÍA

Con la finalidad de cumplir con los objetivos tanto general como específicos descritos previamente para realizar el *Manual de Validación de Métodos Analíticos por CLAR conforme a la categoría I descrita en la FEUM 13va edición*, se realizó una búsqueda bibliográfica entre las que destacan:

- Diferentes normativas internacionales reconocidas como lo son la International Council for Harmonisation, European Pharmacopoeia y United States Pharmacopeia, mediante los apartados Q2(R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Guidance for Industry, Chromatographic separation Techniques (2.2.46) y Validation of Compendial Procedures <1225>, respectivamente.
- Regulación normativa interna de México como la NORMA Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013 como la Norma Mexicana NMX-EC-17025-IMNC-2018.
- Laboratorios oficiales que son el soporte científico para los actos de autoridad que realiza la COFEPRIS como lo es Comisión de Control Analítico y Ampliación de Cobertura (CCAYAC) a través de diferentes guías técnicas como lo son: CCAYAC-P-058 y CCAYAC-CR-04.
- Documentos emitidos por colegios nacionales u asociaciones internacionales como lo es la Guía de Validación de Métodos Analíticos elaborado por el Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México o la Validación de métodos analíticos elaborado por la Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria.

7. DISCUSIÓN

El principal objetivo de cualquier industria farmacéutica es producir productos con las características y la calidad necesarias de forma fiable y rentable. El desarrollo de un método es esencial para el descubrimiento, desarrollo y evaluación de medicamentos en la formulación farmacéutica. La validación es muy importante para el funcionamiento eficaz de las empresas farmacéuticas. En cada etapa, desde la materia prima hasta el acabado, la estabilidad, en todas partes se realiza la validación.^[11]

Cuando se aplica una técnica analítica como CLAR para generar resultados sobre la calidad de las muestras relacionadas con medicamentos, es necesario que los resultados sean confiables.

CLAR es ahora una de las herramientas más poderosas en química analítica para el análisis cuantitativo y cualitativo de productos farmacéuticos. Puede separar, identificar y cuantificar los compuestos que están presentes en cualquier muestra que pueda disolverse en un líquido.^[10]

La mayoría de los medicamentos en formas de dosificación de múltiples componentes pueden analizarse mediante el método de CLAR debido a las diversas ventajas, como la rapidez, la especificidad, la exactitud, la precisión y la facilidad de automatización de este método. El desarrollo y la validación de

métodos de CLAR juegan un papel importante en el nuevo descubrimiento, desarrollo, fabricación de fármacos y otros estudios relacionados con humanos. Se desarrolla un procedimiento analítico para probar una característica definida de la sustancia farmacológica o del producto farmacéutico frente a los criterios de aceptación establecidos para esa característica. [6]

La consideración más importante para las estrategias de validación de métodos es diseñar el trabajo experimental para que las características de validación apropiadas se estudien simultáneamente, minimizando así la cantidad de experimentos que se deben realizar. Por lo tanto, es importante escribir algún tipo de protocolo para ayudar en el proceso de planificación, de modo que, ejecutar el trabajo experimental sin una planificación previa será un desastre para la validación.

Se pueden utilizar diferentes enfoques para validar un método de valoración, sin embargo, es importante entender que el objetivo de la validación es demostrar que un procedimiento es adecuado y como lo indica la NMX 17025, la validación debe ser tan amplia como sea necesaria para satisfacer las necesidades de la aplicación o del campo de aplicación dados siendo coherentes con los requisitos especificados. [13]

8. CONCLUSIÓN

El manual elaborado provee la información requerida para entender qué es la validación, del por qué es necesaria y cómo debe llevarse a cabo de conformidad con un protocolo de validación que detalle las características de desempeño que deben poseer los procedimientos analíticos para demostrar que la técnica es capaz de arrojar resultados confiables. Así como la descripción de las características de desempeño analítico conforme a FEUM (cubriendo las pautas de ICH), como lo son verificación del sistema — Aptitud del sistema, precisión del sistema, linealidad del sistema, especificidad/selectividad, exactitud del método, linealidad e intervalo del método, precisión del método, límite de detección y límite de cuantificación del método, robustez del método y tolerancia del método, están bien definidos con ejemplos desarrollados y ejercicios prácticos con el objetivo de una correcta interpretación de los mismos mediante un contraste de criterios de aceptación para tomar como validos los resultados analíticos procesados. Todo ello es, debido a que, la validación es un proceso necesario en el área farmacéutica empleado para garantizar que la calidad se incluya en el desarrollo, producción y control fisicoquímico de fármacos y/o producto terminado.

9. REFERENCIAS

1. Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria. (2001). *Validación de métodos analíticos*.
2. C. Harris, D. (2016). *Análisis químico cuantitativo. Sexta Edición*. Reverté.
3. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México, A.C. (2002). *Guía de Validación de Métodos Analíticos, 1a. Edición*.
4. Comisión de Control Analítico y Ampliación de Cobertura. (2011). *CCAYAC-P-058. Criterios para la validación de métodos fisicoquímicos*.
5. Comisión de Control Analítico y Ampliación de Cobertura. (2017). *CCAYAC-CR-04. Criterios para la verificación de métodos fisicoquímicos farmacopeicos*.
6. Dadhich, B., Goyal, R., & Agarwal, D. (2020). *A Review On: Development and Validation of HPLC in Pharmaceutical Dosage Form. Asian Journal of Pharmaceutical Research and Development*, 8(4), 110-121.
7. Ermer, J., & Miller, J. H. M. (Eds.). (2014). *Method validation in pharmaceutical analysis: A guide to best practice, Second, Completely Revised and Updated Edition*. John Wiley & Sons.
8. European Pharmacopoeia, EP 10.0. (2019). *Chromatographic separation Techniques (2.2.46)*.
9. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM) 13va Edición; 2021. Secretaría de Salud, Comisión permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos.
10. Isane, S. P., Waghmare, S. A., & Kamble, H. V. (2022). *A Review on Method Development, Validation, Optimization and Applications of HPLC. International Journal for Research in Applied Science & Engineering Technology*. 10 (5), 1860-1867
11. Kachave, R.N., & Jadhav, K.P. (2021). *Analytical Method Development and Validation: A Review*. 9(8), b554-b570.
12. Kowalska, M., Woźniak, M., Kijek, M., Mitrosz, P., Szakiel, J., & Turek, P. (2022). *Management of validation of HPLC method for determination of acetylsalicylic acid impurities in a new pharmaceutical product. Scientific Reports*, 12(1), 1.
13. Norma Mexicana NMX-EC-17025-IMNC-2018, Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración.

14. Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013, Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los Terceros Autorizados que realicen las pruebas de intercambiabilidad. Requisitos para realizar los estudios de biocomparabilidad. Requisitos a que deben sujetarse los Terceros Autorizados, Centros de Investigación o Instituciones Hospitalarias que realicen las pruebas de biocomparabilidad.
15. Q2(R1). (2021). *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Guidance for Industry*.
16. United States Pharmacopeia, USP 41 NF. (2018). *Validation of Compendial Procedures <1225>*.
17. USP Council of Experts, USP Reference Standards Committee, & Hauck, W. W. (2012). *Primary and secondary reference materials for procedures to test the quality of medicines and foods. Pharmaceutical research*, 29, 922-931.
18. Waters Corporation. (29 de julio de 2013). *Waters Alliance e2695 Separations Module Operator Guide* 715003794/Revision B.
<https://www.waters.com/webassets/cms/support/docs/715003794rb.pdf>
19. WHO. Technical Report 943, (2007) *WHO committee on specifications for pharmaceutical preparations, Annex 3, general guidelines for the establishment, maintenance, and distribution of chemical reference standards. Geneva: WHO*.