

Aplicación de Técnicas Estadísticas para la Comprobación de la Exactitud en el Desarrollo de Métodos Analíticos Farmacéuticos *

Carmen ALTESOR, Isabel DOL ** y Moisés KNOCHEN

Cátedra de Análisis Instrumental, Facultad de Química, Universidad de la República, Av. Gral. Flores 2124, 11800 Montevideo, Uruguay

RESUMEN. Se presenta una forma sencilla y rigurosa para la verificación de la exactitud durante la validación de metodologías analíticas. Los cálculos requeridos pueden ser fácilmente implementados en planillas electrónicas, muy comunes actualmente en todos los laboratorios.

SUMMARY. "Application of Statistical Techniques to the Evaluation of Accuracy in the Development of Pharmaceutical Analytical Methods". An easy and rigorous procedure is proposed for the verification of accuracy in the validation of analytical methodologies. The calculations required may be easily programmed on an electronic worksheet, nowadays easily found in every laboratory.

INTRODUCCION

Las exigencias actuales de calidad para las metodologías analíticas, así como la implantación de Buenas Prácticas de Laboratorio (GLP) en el campo del análisis farmacéutico, requieren estrictas normas para la validación de las mismas. Una de las etapas indispensables de la validación de una metodología analítica es la comprobación de la exactitud. Esta implica la ausencia de sesgo, el que es causado por errores sistemáticos. Para esta comprobación es necesario verificar la ausencia tanto de interferencias aditivas como de efectos multiplicativos debidos a la matriz de excipientes.

Frecuentemente se recurre para esta verificación a pruebas de recuperación, pero la decisión final no es apoyada por un criterio objetivo, lo que le resta rigor al procedimiento seguido. Como consecuencia el nuevo método ensayado no será válido para un amplio rango de situaciones.

En el presente trabajo se propone el empleo de métodos multivariantes y una herramienta estadística rigurosa, el ensayo de hipótesis conjunto de la pendiente y la ordenada en el origen para la recta de recuperación: "cantidad obtenida" en

PALABRAS CLAVE: Análisis, Farmacéutico, Exactitud, Validación.

KEY WORDS: Analysis, Pharmaceutical, Accuracy, Validation.

* Trabajo presentado en el Primer Congreso de la Federación Farmacéutica Sudamericana y II Congreso de Ciencias Farmacéuticas del Cono Sur, Montevideo, Uruguay, 4-7 de noviembre de 1993.

** Autor a quien dirigir la correspondencia.

función de "cantidad puesta", para diferentes concentraciones de las posibles sustancias interferentes.

ENSAYOS DE RECUPERACION

Las pruebas de recuperación que hemos mencionado en la introducción consisten en un diseño experimental destinado a determinar la relación entre la cantidad de un analito hallada experimentalmente, mediante un cierto método, y la cantidad real puesta o agregada en ese experimento.

En la práctica habitual, para evaluar la exactitud se suelen emplear diversos ensayos, como los que se mencionan a continuación:

a) Indicar la recuperación determinada para una sola relación analito/matriz. El ensayo suele efectuarse preparando una mezcla sintética que contiene una cantidad perfectamente conocida del analito y una cantidad de matriz tal que la relación analito/matriz es equivalente a la existente en la forma farmacéutica. Se determina el contenido de analito contra patrones mediante el método propuesto y se calcula la recuperación. Esta puede ser cercana al 100%, pero sin embargo pueden no ser tenidas en cuenta las interacciones y, como consecuencia, tendencias que se manifiestan cuando varían las concentraciones de algunas sustancias interferentes.

b) Indicar el valor promedio de las recuperaciones correspondientes a varias relaciones analito/matriz. Similarmente al caso anterior, se preparan mezclas representando diferentes relaciones analito/matriz. Se determina la recuperación para cada una de ellas y se informa el promedio. Presenta iguales inconvenientes que el ensayo anterior.

c) Indicar la recuperación obtenida por adición de analito sobre una muestra. Constituye una aplicación del conocido método de las adiciones estándar o de las adiciones de analito. A diferencia de los anteriores no se realiza sobre mezclas sintéticas, sino sobre alícuotas del producto terminado a las que se adicionan cantidades variables y exactamente conocidas del analito y se determina la respuesta analítica. Se calcula la pendiente de la curva obtenida y se la compara con la correspondiente a la curva de calibración de estándares puros. Habitualmente se ejecuta una versión simplificada, en la que sólo se emplean dos puntos, correspondientes a la muestra antes y después del agregado de analito. La interpretación que se hace en este caso es que la diferencia entre ambas cantidades de analito determinadas debería corresponder exactamente a la cantidad agregada si el método es exacto. Este ensayo permite detectar la existencia de efecto matriz, pero ignora la existencia de interferencias aditivas, ya que se estudia sólo la pendiente. En el caso del método simplificado, cualquier efecto aditivo es cancelado al restar ambos valores y por tanto su presencia pasa inadvertida.

En la alternativa que proponemos, para la verificación de la ausencia de sesgo en una metodología analítica, se recurre a la regresión lineal de las cantidades obtenidas (Y) sobre los cantidades puestas (X):

$$Y = a + bX$$

Para ello es necesario efectuar las suposiciones habituales en el análisis de regresión. Si el método es insesgado, las cantidades halladas deberán guardar con las cantidades puestas una relación lineal con ordenada en el origen nula ($a = 0$)

y pendiente unidad ($b = 1$), ya que en ese caso, el valor hallado es idéntico al real.

Toda medida experimental está afectada de un error aleatorio que se propaga a los resultados analíticos, por lo que en general los resultados experimentales no se ajustarán exactamente a una recta como la indicada; es decir que para la recta obtenida mediante análisis de regresión lineal la ordenada en el origen será ligeramente diferente de 0 y la pendiente no será exactamente 1. Por lo tanto será necesario efectuar ensayos de la significación de los valores experimentales estimados de a y b respecto a los valores "teóricos" de 0 y 1 respectivamente.

Un enfoque clásico para este problema conduciría al empleo de ensayos "t" separados para la pendiente y para la ordenada en el origen, en los que se ensayarían las hipótesis $a = 0$ y $b = 1$ respectivamente ¹.

Sin embargo, tal como lo señalaran tanto Lark ² como Mandel y Linning ³, esos ensayos carecen de validez, porque existe una correlación negativa entre los valores estimados de pendiente y ordenada en el origen obtenidos por el método de los mínimos cuadrados, siendo ambos parámetros estimados a partir del mismo conjunto de datos experimentales, es decir, no son independientes.

Por ese motivo se ha propuesto ⁴ la realización de un ensayo conjunto para los dos parámetros, involucrando una "región de confianza conjunta" en el que se tiene en cuenta la interrelación de los mismos, con las hipótesis:

$$H_0: a = 0; b = 1; \quad H_A: \text{no } H_0; \quad \text{siendo el estadístico:}$$

$$F_{calc} = \frac{n(a'-a)^2 + 2(a'-a)(b'-b)\sum x + (b'-b)^2\sum x^2}{2\sigma^2} \quad [1]$$

con a' y b' estimados de regresión de los parámetros a y b , y

$$\sigma^2 = \frac{1}{n-2} \left\{ \left[\sum y^2 - \frac{(\sum y)^2}{n} \right] - \frac{(\sum xy - \frac{\sum x \sum y}{n})^2}{\sum x^2 - (\sum x)^2} \right\}$$

Se aceptará la hipótesis nula si $F_{calc} \leq F_{(1-\alpha)(2,n-2)}$.

Puesto que la estimación de los parámetros a y b está sujeta a error, existen infinitos pares (a,b) que cumplen con la ecuación [1]. Para un nivel de confianza seleccionado, los mismos se pueden representar en el plano (a,b) bajo forma de una región elíptica inclinada conocida como "región de confianza conjunta" o "elipse de confianza" (Figuras 1 y 2).

PROCEDIMIENTO PROPUESTO

1) Preparar una serie de mezclas variando tanto la concentración del analito como de las sustancias potencialmente interferentes. En beneficio de una máxima eficiencia se recomienda recurrir a un diseño experimental del tipo central compuesto ⁴

2) Determinar las cantidades de analito en esas mezclas mediante el método ensayado.

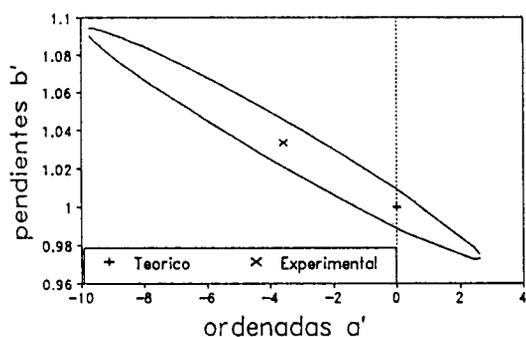


Figura 1. Elipse de confianza. Benzoato de sodio.

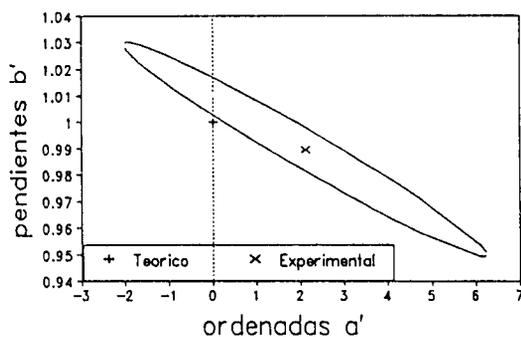


Figura 2. Elipse de confianza. Citrato de butamirato.

3) Determinar mediante regresión lineal la recta de recuperación: "cantidad obtenida" en función de "cantidad puesta".

4) Aplicar el ensayo de hipótesis conjunto de pendiente y ordenada en el origen para dicha recta ("elipse de confianza").

Ejemplos

Se presentan datos correspondientes a la determinación simultánea de benzoato de sodio (BS) y citrato de butamirato (CB) mediante un método espectrofotométrico ultravioleta. Bajo ciertas condiciones se obtuvieron los siguientes resultados:

	BS	CB	Valores de tablas
$b_{cal.}$	1,033	0,990	
$a_{cal.}$	-3,586	2,105	
$t_{pend.}$	1,550	-0,720	$t_{1-\alpha/2}(n-2) = 2.20$
$t_{ord.}$	1,6300	-1,440	$t_{1-\alpha/2}(n-2) = 2.20$
$F_{cal.}$	1,35	6,710	$F_{1-\alpha}(2,n-2) = 3.98$

Como se puede ver en los ejemplos anteriores el método analítico para determinación de CB no cumple con el ensayo propuesto por lo que no es exacto. Sin embargo ambos métodos cumplían los ensayos "t" de pendiente y ordenada por separado. En las figuras 1 y 2 se encuentran representadas las regiones de confianza conjunta para BS y CB.

CONCLUSIONES

El ensayo de hipótesis propuesto provee una forma rápida, sencilla y objetiva de comprobar la exactitud de un método analítico, que es difícil de encontrar en la bibliografía de uso habitual por el químico analítico.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Cochran, W.C. y G.M. Cox (1965) "Diseños Experimentales". Editorial Trillas
2. Lark, P.D. (1954) *Anal. Chem.* **26**: 1712-5
3. Mandel, J., y F.J. Linning (1957) *Anal. Chem.* **29**: 743-9
4. Massart, D.L., B.G.M. Vandeginste, S.N. Deming, Y. Michotte y L. Kaufman (1988) "Chemometrics: a textbook". Elsevier, Amsterdam