

VALIDACIÓN ANALÍTICA: APLICACION A UN MÉTODO POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION PARA EL ANALISIS DE BENZODIACEPINAS.

A. Bamio-Nuez, B. Artalejo-Ortega. A. del Pozo Carrascosa y C. Faulí Trillo.

Departamento de Farmacia, Unidad Funcional de Farmacia Galénica, Facultad de Farmacia, Núcleo Universitario de Pedralbes, Avenida Joan XXIII s/n, 08028 BARCELONA, España.

La validación analítica puede definirse como un proceso mediante el cual se demuestra la aplicabilidad de un método analítico. El término validación incluye, pues, la obtención de pruebas que demuestren que un método es lo suficientemente fiable como para producir resultados previstos dentro de intervalos definidos.

En toda validación debe existir una documentación detallada y precisa de las operaciones implicadas así como también de cálculos y resultados. De hecho validar es demostrar documentalmente que un método analítico posee todos los requisitos para el uso propuesto.

Existen varias razones por las cuales es necesaria la validación analítica: permite un conocimiento profundo de las características de funcionamiento de un método, proporciona confianza tanto en el método como en los resultados obtenidos, cumplimiento de normativas legales, etc.

Las características de funcionamiento del método analítico se expresan en términos de precisión, exactitud, límites de detección y cuantificación, linealidad, etc.

En el presente trabajo se valida un método por cromatografía líquida de alta resolución para el análisis de benzodiazepinas. En esta validación se tienen en cuenta tanto criterios cromatográficos como funcionales y estadísticos.

Material v métodos.

Material.

Para la realización del presente trabajo se ha utilizado diazepam¹ (DCP), temazepam¹ (TMC) y 2-metilamino-5-clorobenzofenona¹ (MACB).

Métodos.

Las muestras a analizar se han preparado disolviendo la cantidad necesaria de cada producto para obtener soluciones de concentración igual a 10 µ/ml en metanol calidad HPLC. Antes de la inyección se han filtrado las muestras por una membrana de 0.22 µm.

La fase móvil ha consistido en una mezcla de metanol y agua en la proporción 70:30. La desgasificación de la misma se ha realizado mediante filtración y vacío y también mediante borboteo de helio. Se han utilizado dos equipos modulares de la marca Waters. La fase móvil ha consistido en columnas Novapack ¹ C18, el volumen de inyección, 25 μ l, el flujo de fase móvil, 1ml/min y la detección a 254 nm.

Resultados y discusión.

La figura nº 1 recoge los cromatogramas correspondientes a muestras que contienen DCP + MACB y TMC + MACB.

Los parámetros calculados para estos cromatogramas se recogen en la tabla nº 1.

	DZP		TMZ
Rs	11.42		12.47
K' (DCP)	1.44	(TMC)	0.9
K' (MACB)	5.72	(MACB)	5.72
α	3.97		5.8
N (DCP)	4756	(TMC)	4431
N (MACB)	4126		4152

Tabla nº 1 a. Parámetros cromatográficos obtenidos con el instrumento A.

La linealidad del método analítico se determina mediante la correspondiente recta de regresión calculada a partir de los valores representados en la tabla nº 2. La representación gráfica de dicha recta se recoge en la figura nº 2.

¹ ACOFARMA S.Coop.

¹ ACOFARMA S.Coop.

¹ SIGMA

<u>Valores de X</u>	<u>Valores de Y</u>	<u>Valores de Y/X</u>
12	90101	7508.41
12	89975	7497091
12	90213	7157.75
11	82606	7509.63
11	82351	7486.45
11	82518	7501.63
10	75074	7507.40
10	74870	7487.00
10	75201	7520.10
9	67199	7466.55
9	67221	7469.00
9	67305	7478.33
8	60793	7599.12
8	60541	7567.62
8	60237	7529.62

Tabla nº 2. Valores de X e Y para la regresión del diacepam.

La tabla nº 3 recoge los estadísticos correspondientes a dicha regresión.

Coefficiente de correlación, r	=	.9996 (P>.99)
Coefficiente de determinación, r ²	=	.9992
Término independiente	=	685.0078
Pendiente	=	7439.533
Varianza del error experimental	=	86331.08
Varianza del término independiente	=	293525.7
Varianza de la pendiente	=	2877.703
Desviación estándar de la pendiente	=	53.644

Tabla nº 3. Valores estadísticos correspondientes a la regresión del DCP.

El valor crítico tabulado del coeficiente de correlación para 13 grados de libertad y una probabilidad > 99% es de 0.760. El valor de "r" asociado a esta recta indica, pues, una correlación satisfactoria. El valor del coeficiente de determinación indica que el 99,92% de la varianza total puede ser explicada por la variable independiente.

En la tabla nº 2 se observa que los factores de respuesta son similares entre sí y a la vez próximos. Así pues, el coeficiente de variación porcentual de los factores de respuesta (CV = 0.41%) puede tomarse como una expresión satisfactoria de la linealidad.

En lo referente a la linealidad de la pendiente puede establecerse la hipótesis nula, H_0 , como $b = 0$. El valor de la "t" de Student experimental es de 138.68 el cual es mayor que el valor tabulado para 13 grados de libertad y $\alpha = 0.01$ (3.012) con lo que se cumple que la pendiente no es paralela al eje de abscisas.

Por otro lado, el término independiente no difiere significativamente de cero, ya que el valor de la "t" de Student experimental (1.26) es menor que el valor tabulado y se cumple la hipótesis nula ($H_0: a = 0$).

Para la determinación de la precisión del método se realizan 10 análisis sucesivos obteniéndose los valores que se recogen en la tabla nº 4.

Resultados	10.2	10.0	($\mu\text{g/ml}$)
	10.1	10.1	
	10.1	10.1	
	9.8	9.9	
	10.1	10.2	
Valor medio			= 10.06
Desviación estándar			= 0.126
Coefficiente de variación			= 1.23%
Int. confianza individuales	= 10.34	-	9.77 $\mu\text{g/ml}$
Int. confianza de la media	= 10.14	-	9.97 $\mu\text{g/ml}$

Tabla nº 4. Valores correspondientes a la precisión del método para el DCP.

Para el estudio de la reproducibilidad se realizan análisis por triplicado en tres días y en dos instrumentos. Los resultados del análisis de la varianza se exponen a continuación:

DATOS CORRESPONDIENTES A 2 INSTRUMENTOS Y 3 DIAS CON 3 REPLICAS CADA DIA

	1 día	2 día	3 día
1 instrumento	10.1	10.1	10.0
	10.2	9.9	10.1
	10.0	10.1	10.2
2 instrumento	10.2	10.2	10.0
	10.1	10.2	10.1
	10.1	10.1	10.0

FUENTE VARIANZA SUMA CUADRADOS GRADOS LIBERTAD CUADRADOS MEDIOS

Instrumento	4.760742E-03	1	4.760742E-03
Día	7.69043E-03	2	3.845215E-03
Interacción	.0300293	2	1.501465E-02
Residuales	8.691406E-02	12	7.242839E-03
Total	.1293945	17	

VALOR DE F ENTRE INSTRUMENTOS = .6573034
 VALOR DE F CRITICO A UN 95% PARA 1 Y 2 GRADOS DE LIBERTAD = 4.747
 NO EXISTEN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ENTRE LOS RESULTADOS OBTENIDOS MEDIANTE LOS DIFERENTES INSTRUMENTOS.

VALOR DE F ENTRE DIAS = .5308989
 VALOR DE F CRITICO A UN 95% PARA 2 Y 12 GRADOS DE LIBERTAD ES 3.885
 NO EXISTEN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ENTRE LOS RESULTADOS OBTENIDOS PARA LOS DIFERENTES DIAS.

De la misma manera, se realizan análisis por triplicado, en un mismo instrumento, en tres días y por dos analistas diferentes. Los resultados del análisis se exponen a continuación:

DATOS INICIALES CORRESPONDIENTES A 2 ANALISTA Y 3 DIAS CON 3 REPLICAS CADA DIA

	1 día	2 día	3 día
1 analista	10.0	9.9	10.1
	10.1	10.2	10.1
	9.8	10.0	10.0
2 analista	9.8	10.0	10.1
	10.1	10.0	10.1
	10.2	10.1	10.1

FUENTE VARIANZA SUMA CUADRADOS GRADOS LIBERTAD CUADRADOS MEDIOS

Analista	2.319336E-03	1	2.319336E-03
Día	1.330566E-02	2	6.652832E-03
Interacción	4.394532E-03	2	2.197266E-03
Residuales	.1999512	12	.0166626
Total	.2199707	17	

VALOR DE F ENTRE ANALISTAS = .1391942

VALOR DE F CRITICO A UN 95% PARA 1 Y 2 GRADOS DE LIBERTAD = 4.747

NO EXISTEN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ENTRE LOS RESULTADOS OBTENIDOS POR LOS DIFERENTES ANALISTAS

VALOR DE F ENTRE DIAS = .3992674

VALOR DE F CRITICO A UN 95% PARA 2 Y 12 GRADOS DE LIBERTAD = 3.885

NO EXISTEN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ENTRE LOS RESULTADOS OBTENIDOS PARA LOS DIFERENTES DIAS

La determinación de los límites de determinación y cuantificación de MACB se realiza por extrapolación a concentración cero. Para ello se construye una recta de regresión a partir de soluciones de concentraciones bajas de MACB. Los valores de dicha regresión se recogen en la tabla nº 5.

Valores de X	Valores de Y	Valores medios de Y	Desv. estánd. de Y
2	15201	15039.33	104.54
2	15023		
2	14894		
3	22305	22293.66	142.338
3	22430		
3	22146		
4	30132	30120.66	134.35
4	30249		
4	29981		
Coeficiente de correlación		.9995782	(P>.99)
Término independiente		-137.4453	
Pendiente		7540.667	
Variancia debida al error experimental		41106.29	
Variancia del termino independiente		66226.79	
Variancia de la pendiente		6851.048	

Tabla nº 5. Valores de regresión para la MACB.

Para el cálculo de dichos límites se aplican las siguientes expresiones:

$$\text{lim. det.} = \frac{y_{11} + 3s_{11}}{b} \cdot \frac{1}{\sqrt{n'}}$$

$$\text{lim. cuant} = \frac{y_{11} + 10s_{11}}{b} \cdot \frac{1}{\sqrt{n'}}$$

donde y_{11} : respuesta a concentración cero
 s_{11} : desviación estándar a concentración cero
 b : pendiente
 n' : número de réplicas.

El valor hallado para el límite de detección de MACB es de 0.008 $\mu\text{g/ml}$ y el límite de cuantificación es de 0.05 $\mu\text{g/ml}$.

Las tablas nº 6 a la 9 recogen los valores obtenidos para el caso de aplicar el método a una muestra que contiene TMC y MACB.

En ellas se observa, así mismo que el coeficiente de correlación de la recta de regresión indica una correlación óptima. Para el caso del TMC, el coeficiente de variación porcentual de los factores de respuesta es igual a 1.21%.

Los valores obtenidos permiten demostrar, así mismo que la pendiente es distinta de cero y que el término independiente no difiere significativamente de cero, es decir, el método no presenta sesgo asociado.

El análisis de la varianza indica que no existen diferencias significativas para los distintos instrumentos, ni para los distintos días ni para los analistas.

Bibliografía.

- Caporal J. et al. STP Pharma, 6 (8), 588-594 (1990).
- Garcés J., Mariné A. y Codony R. C.I.F., 7, 182-189 (1988).
- Hamilton R.J. and Sewell P.A. "Introduction to High Performance Liquid Chromatography". Ed. by Chapman & Hall. London (1977).
- Leconte D. STP Pharma, 2 (nº hors série), 843-849 (1986).
- Miller J.C. and Miller J.N. "Statistics for Analytical Chemistry". Ed By Ellis Horwood Ltd. New York (1984).
- Pasteelnick L.A. "Analytical Methods Validation" en "Pharmaceutical Process Validation". Ed. by Loftus B.T. and Nash R.A. Drugs and the Pharmaceutical Sciences, 23 (1984).
- U.S.P. XXII Edition, 1710-1712.

<u>Valores de X</u>	<u>Valores de Y</u>	<u>Valores de Y/X</u>
12	96883	8073.58
12	96325	8027.08
12	96901	8075.08
11	88810	8073.63
11	88796	8072.36
11	87952	7995.63
10	80736	8073.6
10	79045	7904.5
10	81001	8100.1
9	72662	8073.55
9	70591	7843.44
9	71899	7988.77
8	64588	8073.5
8	66032	8254.0
8	65371	8171.3

Coefficiente de correlación , r	= .9997 (P>.99)
Coefficiente de determinación, r ²	= .9994
Término independiente	= 958.7969
Pendiente	= 7954.734
Varianza del error experimental	= 794624
Varianza del término independiente	= 2701722
Varianza de la pendiente	= 26487.47
Desviación estándar de la pendiente	= 162.75

Tabla nº 6. Valores estadísticos de la regresión del TMC.

Resultados	9.8	10.0	($\mu\text{g/ml}$)
	10.1	10.2	
	10.1	10.1	
	9.9	10.2	
	9.7	10.1	
Valor medio		= 10.02	
Desviación estándar		= 0.168	
Coeficiente de variación		= 1.67%	
Int. confianza individuales		= 10.39 - 9.64 $\mu\text{g/ml}$	
Int. confianza de la media		= 10.13 - 9.90 $\mu\text{g/ml}$	

Tabla nº 7. Valores correspondientes a la precisión del método para el TMC.

DATOS INICIALES CORRESPONDIENTES A 2 INSTRUMENTOS Y 3 DIAS CON TRES REPLICAS DE CADA DIA

	1 día	2 día	3 día
1 instrumento	10.2	10.0	10.1
	10.1	10.1	10.1
	10.2	10.1	10.0
2 instrumento	10.2	10.1	10.0
	10.0	10.2	10.1
	10.2	10.1	10.0

FUENTE VARIANZA	SUMA CUADRADOS	Gr. LIBERTAD	CUADRADOS MEDIO
Instrumento	0	1	0
Día	2.97E-02	2	1.489E-02
Interacción	1.01E-02	2	5.063E-03
Residuales	5.99E-02	12	4.994E-03
Total	9.98E-02	17	

VALOR DE F ENTRE INSTRUMENTOS = 0

VALOR DE F CRITICO A UN 95% PARA 1 Y 12 GRADOS DE LIBERTAD = 4.747

NO EXISTEN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ENTRE LOS RESULTADOS OBTENIDOS POR LOS DIFERENTES INSTRUMENTOS.

VALOR DE F ENTRE DIAS = 2.98167

VALOR DE F CRITICO A UN 95% PAR 2 Y 12 GRADOS DE LIBERTAD = 3.885

NO EXISTEN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ENTRE LOS RESULTADOS OBTENIDOS MEDIANTE LOS DIFERENTES DIAS.

Tabla nº 8. Resultados del análisis de la varianza correspondientes a 2 instrumentos y 3 días para el

TMC.

DATOS INICIALES CORRESPONDIENTES A 2 ANALISTAS Y 3 DIAS CON 3 REPLICAS CADA DIA

	1 día	2 día	3 día
1 analista	10.0	9.8	9.8
	10.1	10.1	10.
	9.8	10.1	10.1
2 analista	10.1	9.9	10.0
	10.1	10.0	10.1
	10.1	10.1	9.8

FUENTE VARIANZA	SUMA CUADRADOS	Gr. LIBERTAD	CUADRADOS MEDIOS
Analista	5.00E-03	1	5.00E-03
Día	0.0078	2	3.90E-03
Interacción	2.35E-02	2	1.17E-02
Residuales	0.1932	12	1.61E-02
Total	0.2296	17	

VALOR DE F ENTRE ANALISTAS = .3108023

VALOR DE F CRITICO A UN 95% PAR 1 Y 12 GRADOS DE LIBERTAD = 3.885
 NO EXSITEN DIFERENCIS SIGNIFICATIVAS ENTRE LOS RESULTADOS OBTENIDOS
 POR LOS DIFERENTES ANALISTAS

VALOR DE F ENTRE DIAS = .2425774

VALOR DE F CRITICO A UN 95% PARA 2 Y 12 GRADOS DE LIBERTAD = 3.885
 NO EXISTEN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ENTRE LOS RESULTADOS
 OBTENIDOS MEDIANTE LOS DIFERENTES DIAS.

Tabla nº 9. Resultados del análisis de la varianza correspondientes a 2 analistas y 3 días para el TMC.

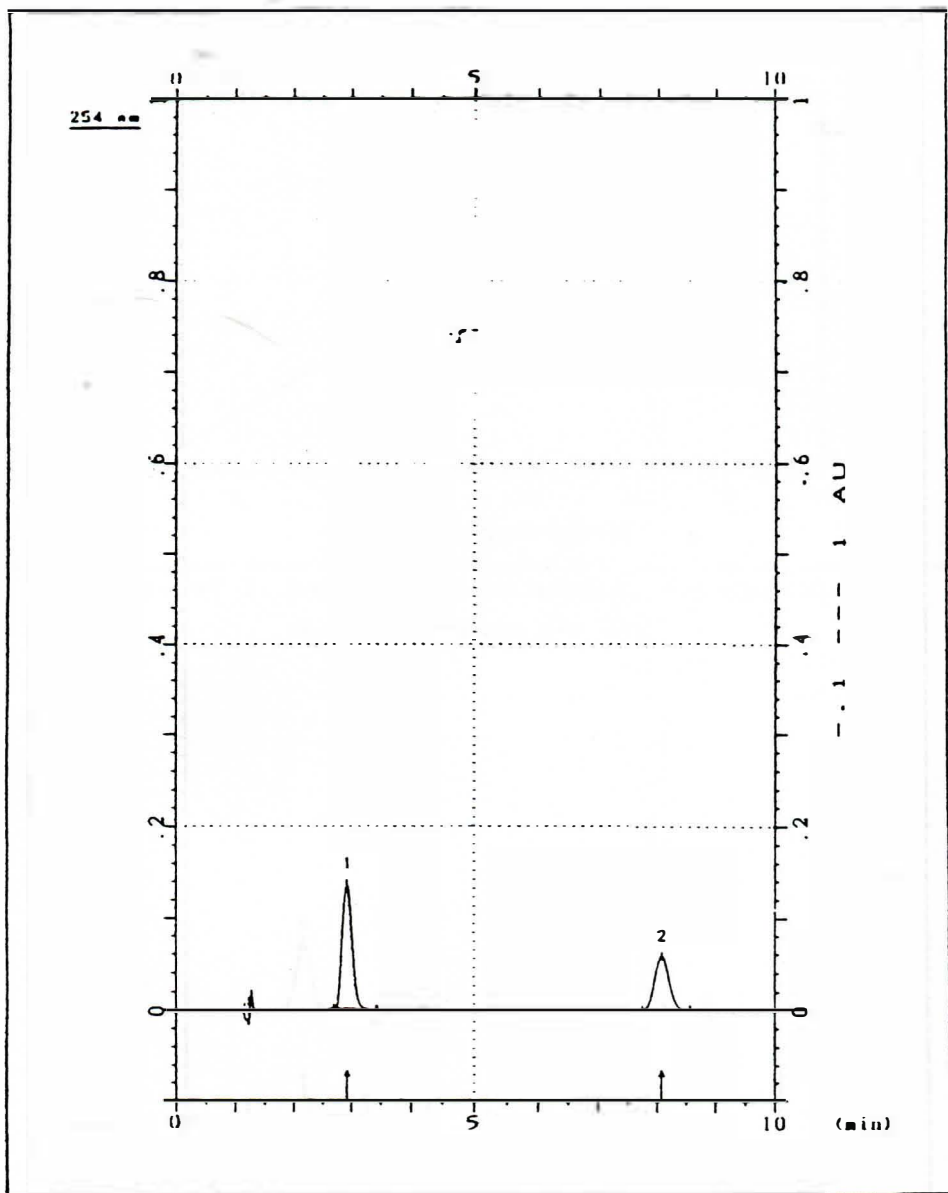


Figura nº 1. Cromatograma correspondiente a la muestra que contiene DCP + MACB.

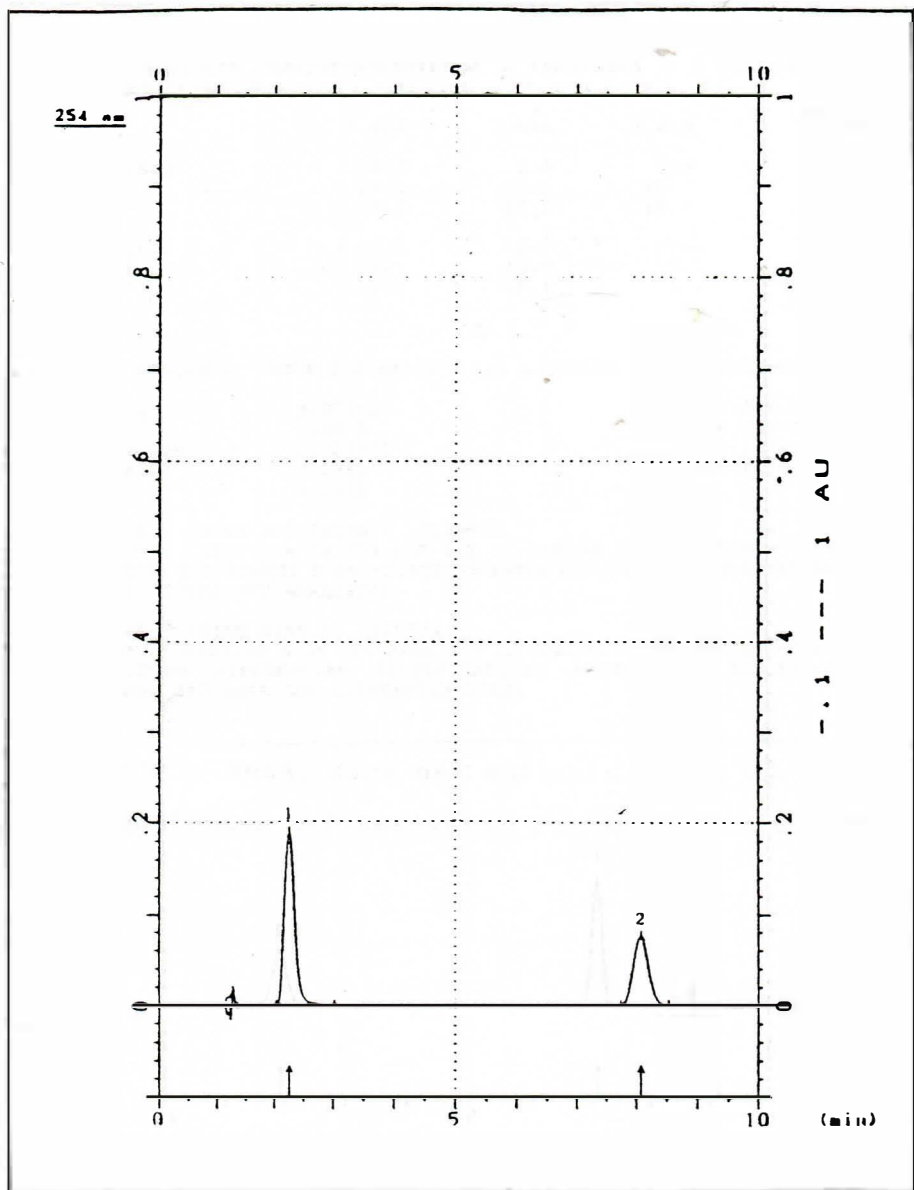


Figura nº 2. Cromatograma correspondiente a la muestra que contiene TMC + MACB.

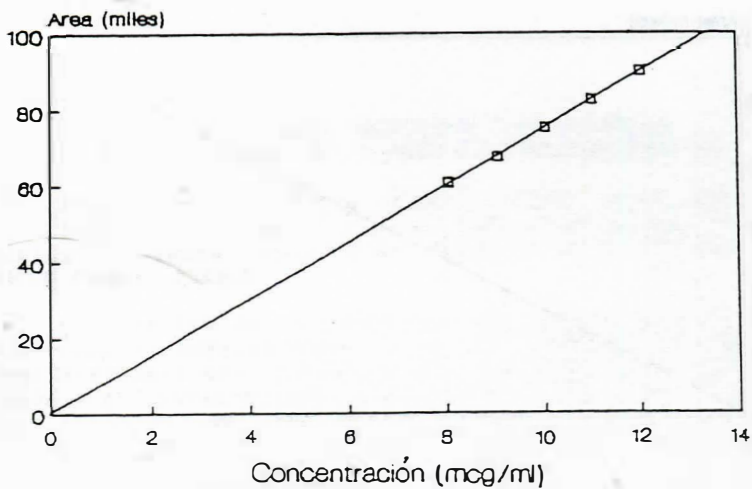


Figura nº 3. Representación gráfica correspondiente a la regresión del DCP.

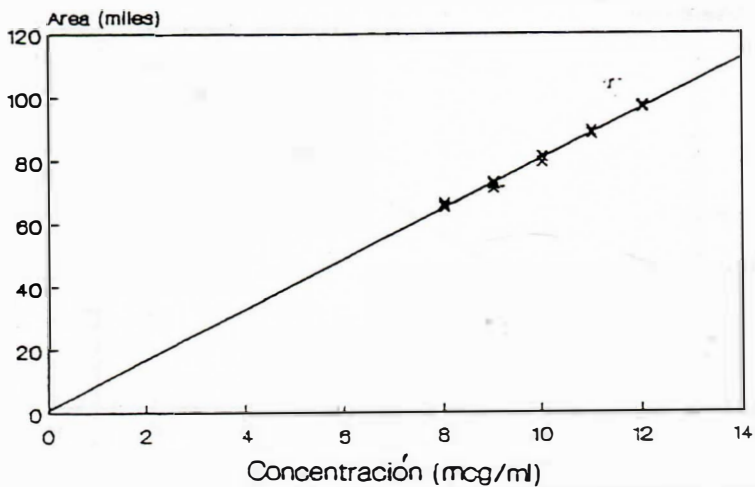


Figura nº 4. Representación gráfica correspondiente a la regresión del TMC.