

⟨1210⟩ MÉTODOS ESTADÍSTICOS PARA LA VALIDACIÓN DE PROCEDIMIENTOS ANALÍTICOS

1. INTRODUCCIÓN
 2. CONSIDERACIONES PREVIAS A LA VALIDACIÓN
 3. EXACTITUD Y PRECISIÓN
 - 3.1 Métodos para Estimar Exactitud y Precisión
 - 3.2 Validación Combinada de Exactitud y Precisión
 4. LÍMITES DE DETECCIÓN Y DE CUANTIFICACIÓN
 - 4.1 Estimación del límite de detección
 - 4.2 Estimación del límite de cuantificación
 5. COMENTARIOS FINALES
- REFERENCIAS

1. INTRODUCCIÓN

Este capítulo describe el uso de enfoques estadísticos en la validación de procedimientos analíticos descrita en el capítulo *Validación de Procedimientos Farmacopeicos* (1225). Para los propósitos de este capítulo, “validación del procedimiento” se refiere a la etapa del ciclo de vida del método que corresponde a la calificación del procedimiento analítico posterior al diseño y desarrollo, y anterior a su implementación en pruebas.

El capítulo (1225) explica que las capacidades de un procedimiento analítico deben validarse basándose en el uso previsto del procedimiento analítico. El capítulo (1225) también describe tipos de usos comunes y sugiere categorías de procedimiento (I, II, III o IV) basadas en la recopilación de parámetros de desempeño apropiados para estos usos. Los parámetros de desempeño que puede ser necesario establecer durante la validación incluyen exactitud, precisión, especificidad, límite de detección (LOD, por sus siglas en inglés), límite de cuantificación, linealidad e intervalo. En algunas situaciones (p. ej., valoraciones biológicas), la exactitud relativa reemplaza la exactitud. Este capítulo se enfoca en cómo establecer las características de desempeño analítico de exactitud, precisión y límite de detección. Para procedimientos analíticos cuantitativos, la exactitud solo puede evaluarse si se tiene un valor de referencia verdadero o aceptado. En algunos casos, será necesario evaluar la exactitud relativa. En muchos procedimientos analíticos, la precisión se puede evaluar aun cuando no se pueda evaluar la exactitud. La sección que trata del límite de detección puede aplicarse a las pruebas de límite de la Categoría II.

El otro tipo de características de desempeño analítico consideradas en el capítulo (1225), que incluyen especificidad, robustez y linealidad, se encuentran fuera del alcance de este capítulo.

Ya que la validación debe proveer evidencia de la aptitud de un procedimiento para el propósito, el paradigma de prueba de hipótesis estadística se usa comúnmente para realizar una validación de manera coherente con el capítulo (1225). Aunque se proveen algunos ejemplos de intervalos estadísticos en 3. *Exactitud y Precisión*, estos métodos no tienen como objetivo representar la única forma de abordar el análisis de datos o insinuar que otros métodos alternativos no sean adecuados.

La *Tabla 1* provee la terminología usada para describir un procedimiento analítico en este capítulo. Las definiciones de determinación individual y valor de informe son coherentes con lo expresado en *Advertencias Generales, 7.10 Interpretación de los Requisitos*.

Tabla 1. Terminología de Validación de Procedimientos Analíticos

Terminología	Descripción
Muestra de laboratorio	Material recibido por el laboratorio
Muestra analítica	Material creado mediante cualquier tipo de manipulación física de la muestra de laboratorio, tal como trituración o molienda
Porción de prueba	Cantidad (alícuota) de material tomada de la muestra analítica para el análisis
Solución de prueba	Solución resultante de la manipulación química de la porción de prueba, tal como derivatización química del analito en la porción de prueba o disolución de la porción de prueba
Determinación individual (ID, por sus siglas en inglés)	Valor numérico medido de una sola unidad de solución de prueba
Valor de informe	Valor promedio de las lecturas de una o más unidades de una solución de prueba

No todos los procedimientos analíticos siguen todas las etapas indicadas en la *Tabla 1*. Por ejemplo, las muestras de laboratorio líquidas que no requieren manipulación adicional avanzan directamente a la etapa de solución de prueba. El foco de la validación analítica está en demostrar que un valor de informe es adecuado para un uso particular.

La *Tabla 2* provee un ejemplo de la terminología de la *Tabla 1* aplicada a una forma farmacéutica oral sólida.

Tabla 2. Ejemplo para Tabletas Recubiertas

Terminología	Descripción
Muestra de laboratorio	100 tabletas recubiertas
Muestra analítica	Se retiran 20 tabletas de la muestra de laboratorio y se Trituran con un mortero y su mano

Tabla 2. Ejemplo para Tabletas Recubiertas (continuación)

Terminología	Descripción			
Porción de prueba	Repetición 1: 1 g de la alícuota de polvo triturado de la muestra analítica		Repetición 2: 1 g de la alícuota de polvo triturado de la muestra analítica	
Solución de prueba	Repetición 1: La porción de prueba se disuelve en 1 L de disolvente		Repetición 2: La porción de prueba se disuelve en 1 L de disolvente	
Determinación individual (ID)	ID 1 de repetición 1: solución de prueba	ID 2 de repetición 1: solución de prueba	ID 1 de repetición 2: solución de prueba	ID 2 de repetición 2: solución de prueba
Valor de informe	Valor promedio de las cuatro lecturas			

2. CONSIDERACIONES PREVIAS A LA VALIDACIÓN

La validación del procedimiento es fundamental en el proceso de establecimiento de un procedimiento analítico. El objetivo de la validación del procedimiento es demostrar que el procedimiento, cuando se realiza en condiciones estándares, cumplirá con el requisito de ser adecuado para su uso. Para maximizar la probabilidad de una validación exitosa, es indispensable que todos los aspectos del procedimiento se conozcan bien antes de la validación. Hallazgos inesperados (ya sean "buenos" o "malos") durante la validación se deben evaluar cuidadosamente para determinar si el procedimiento se desarrolló de manera adecuada. Asimismo, el trabajo previo a la validación puede revelar estrategias adecuadas para reducir el tamaño total del experimento de validación sin aumentar el riesgo de llegar a conclusiones erróneas. Los principios y planes generales para la preparación de muestras, los principios generales, el diseño experimental, la recolección de datos, la evaluación estadística y la selección de los criterios de aceptación deben documentarse en un protocolo experimental de validación que se firma antes de iniciar la validación formal.

Las preguntas que deben considerarse antes de la validación pueden incluir:

- ¿Cuáles son los intervalos permitidos para los parámetros operacionales, tales como temperatura y tiempo, que afectan el desempeño del procedimiento analítico?
 - La robustez de estos intervalos se puede determinar usando un diseño estadístico de experimentos (DOE, por sus siglas en inglés).
- ¿Cuáles son los factores de tolerancia que afectan la precisión?
 - Los factores como el analista, día, lote de reactivo, proveedor del reactivo y el instrumento que afectan la precisión de un procedimiento de prueba se llaman factores de tolerancia. Cuando los factores de tolerancia afectan la precisión, los valores de informe dentro del mismo grupo de tolerancia (p. ej., analista) se correlacionan. Dependiendo del grado de correlación, puede ser necesario un análisis estadístico que tenga en cuenta, de manera apropiada, esta dependencia. Los factores de tolerancia pueden identificarse empíricamente durante la prevalidación o basándose en una evaluación de riesgo.
- ¿Se satisfacen de manera razonable los supuestos estadísticos con respecto al análisis de datos?
 - Estos supuestos pueden incluir factores tales como la normalidad, homogeneidad de la varianza e independencia. Es útil usar pruebas estadísticas o representaciones visuales durante la prevalidación para responder estas preguntas. El capítulo *Datos Analíticos—Interpretación y Tratamiento* (1010) provee información sobre este tema.
- ¿Cuál es el intervalo requerido para el procedimiento?
 - El intervalo de un procedimiento analítico es el intervalo entre los niveles superior e inferior de un analito en el que se ha demostrado que dicho analito se puede determinar con un nivel adecuado de precisión, exactitud y linealidad siguiendo el procedimiento tal como está escrito.
- ¿Existen resultados o valores de referencia aceptados de un procedimiento establecido para la validación de la exactitud?
 - De no ser así, según se indica en la pauta Q2 de la Conferencia Internacional sobre Armonización (ICH, por sus siglas en inglés), la exactitud puede inferirse una vez que se hayan establecido la precisión, linealidad y especificidad.
- ¿Cuántas determinaciones individuales conforman el valor de informe y cómo serán combinadas?
 - Para responder a esta pregunta, es necesario entender los factores que contribuyen a la varianza del procedimiento y el propósito final del procedimiento. Estimar los componentes de la varianza durante la prevalidación proporciona información útil al momento de tomar esta decisión.
- ¿Cuáles son los criterios de aceptación apropiados para la validación?
 - La validación es exitosa cuando hay evidencia estadística de que la valoración se desempeña cumpliendo ciertos niveles mínimos, previamente especificados, para cada parámetro de validación pertinente.
 - ¿Qué determina que la valoración sea apta para su uso y cómo se relaciona esto con los criterios de aceptación?
- ¿Qué tan extenso debe ser el experimento de validación?
 - Los experimentos de validación deben tener potencia estadística adecuada para asegurar que existan suficientes datos para concluir que la exactitud y la precisión pueden cumplir con los criterios de aceptación especificados previamente. La simulación por computadora es una herramienta útil para calcular la potencia estadística.
 - Se puede aumentar la eficiencia (estadística y de costos) si se combina la evaluación de la linealidad, exactitud y precisión.

Se puede diseñar un protocolo experimental de validación adecuado basándose en las respuestas a estas y otras preguntas similares.

Cambio en la redacción:

3. EXACTITUD Y PRECISIÓN

Un modelo útil para representar un valor de informe es:

$$Y = \tau + \beta + E \quad (1)$$

- Y = valor de informe
- τ = valor de referencia verdadero o aceptado
- β = sesgo sistemático del procedimiento
- E = error aleatorio de medición

Ambos, τ (tau) y β (beta) son parámetros estadísticos fijos y E es una variable aleatoria normal con una media de cero y una desviación estándar σ (sigma). La magnitud de σ depende del número de lecturas individuales promediadas para obtener el valor de informe.

La exactitud de un procedimiento analítico expresa el grado de concordancia entre τ y Y . El grado de concordancia se expresa como el promedio a largo plazo de $(Y - \tau)$. Este promedio a largo plazo se conoce como sesgo sistemático y es representado como β . Para estimar β , es necesario conocer el valor verdadero τ . El capítulo <1225> menciona que se puede usar un estándar de referencia o un procedimiento ortogonal caracterizado adecuadamente para asignar el valor de τ . La exactitud debe establecerse a lo largo del rango requerido del procedimiento.

La precisión de un procedimiento analítico es el grado de concordancia entre los valores de informe cuando se aplica el procedimiento repetidamente (posiblemente en condiciones diferentes) a múltiples porciones de prueba de una muestra analítica específica. La métrica de precisión más común es la desviación estándar σ . Esto se indica en la Ecuación 4 con la variable S . El término σ^2 se denomina varianza. La precisión mejora a medida que σ disminuye. Muchos de los procedimientos estadísticos de uso frecuente se basan en el supuesto de una distribución normal, por lo cual σ es un descriptor natural de la variabilidad.

3.1 Métodos para Estimar Exactitud y Precisión

Se provee un ejemplo para demostrar un procedimiento de prueba para la liberación de un lote usando análisis estadístico. Este ejemplo usa cromatografía de líquidos de alta resolución. Ya que el fármaco medido es una sustancia farmacopeica *USP*, la información acerca de τ se encuentra disponible (1). Tres cantidades diferentes del estándar de referencia fueron pesadas de manera que correspondieran a tres porcentajes diferentes de las concentraciones de prueba: 50%; 100% y 150%. La unidad de medición de cada valor de informe es la fracción de masa del fármaco expresada en unidades de mg/g y no cambia a medida que varía el nivel de concentración. El valor de τ es 1000 mg/g para las tres concentraciones. Los cálculos estadísticos realizados a partir del conjunto de datos de validación incluyen la media de la muestra (\bar{Y}), la desviación estándar de la muestra (S) y el número de valores de informe (n). La Tabla 3 presenta $n = 9$ valores de informe y los resultados de los cálculos estadísticos.

Tabla 3. Valores de Informe para el Experimento

Concentración de Prueba (%)	Solución de Prueba	Valor de Informe (mg/g)
50	1	996,07
50	2	988,43
50	3	995,90
100	4	987,22
100	5	990,53
100	6	999,39
150	7	996,33
150	8	993,67
150	9	987,76
Media de la muestra (\bar{Y})		992,81
Desviación estándar de la muestra (S)		4,44

Para los propósitos de este ejemplo se hacen varios supuestos que permiten el análisis del conjunto de datos agrupados en la Tabla 3:

1. Todos los valores de informe $n = 9$ son independientes.
2. La desviación estándar del valor de informe es constante en los tres niveles de concentración. Si no se cumple con esta condición, se pueden realizar transformaciones de los datos que permitan su agrupación en la Tabla 3 (combinación o pooling). Si las transformaciones no son exitosas, se debe validar por separado la precisión para cada nivel de concentración.
3. El valor de informe promedio es igual en todos los niveles de concentración. Si esta condición no se mantiene, es necesario emplear un modelo de análisis de varianza y validar por separado la exactitud para cada nivel de concentración.

El estimador puntual para un sesgo desconocido β es:

4

$$\beta = \bar{Y} - \tau \quad (2)$$

β = sesgo sistemático
 \bar{Y} = media de la muestra
 τ = valor de referencia verdadero o aceptado

donde

$$\bar{Y} = \frac{\sum_{i=1}^n Y_i}{n} \quad (3)$$

\bar{Y} = media de la muestra
 Y_i = valores individuales
 n = número de valores de informe

El estimador puntual para el valor desconocido de σ es

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (Y_i - \bar{Y})^2}{n-1}} \quad (4)$$

S = estimador puntual para el valor desconocido de σ
 Y_i = valores individuales
 \bar{Y} = media de la muestra
 n = número de valores de informe

Ya que los estimadores puntuales tienen cierta incertidumbre asociada, las buenas prácticas requieren el cálculo de un intervalo de confianza estadística para cuantificar la incertidumbre. Los intervalos de confianza estadística proporcionan un rango de valores posibles para β y σ para un nivel dado de confianza. Un intervalo de confianza bilateral $100(1 - 2\alpha)\%$ para el sesgo β es

$$(\bar{Y} - \tau) \pm t_{1-\alpha:n-1} \times \frac{S}{\sqrt{n}} \quad (5)$$

β = intervalo de confianza bilateral de $100(1 - 2\alpha)\%$ para el sesgo
 $t_{1-\alpha:n-1}$ = percentil de la distribución t central con un área de $1 - \alpha$ a la izquierda y $(n - 1)$ grados de libertad
 S = resultados de la Ecuación 4
 n = número de valores de informe

Por ejemplo, con $\alpha = 0,05$ y $n = 9$, $t_{0,95:8} = 1,860$ provee un $100(1 - 2 \times 0,05)\% =$ intervalo de confianza bilateral del 90% para β . Usando los datos del ejemplo en la *Tabla 3* con $\tau = 1000$ mg/g, el intervalo de confianza del 90% en β es

$$(\bar{Y} - \tau) \pm t_{1-\alpha;n-1} \times \frac{S}{\sqrt{n}}$$

$$(992,81 - 1000) \pm 1,86 \times \frac{4,44}{\sqrt{9}} \quad (6)$$

$$[-9,94 \text{ a } -4,44] \text{ mg/g}$$

β = intervalo de confianza bilateral de $100(1 - 2\alpha)\%$ para el sesgo
 $t_{1-\alpha;n-1}$ = percentil de la distribución t central con un área de $1 - \alpha$ a la izquierda y $(n - 1)$ grados de libertad
 S = resultados de la Ecuación 4

Para la desviación estándar, solo interesa el límite superior de confianza $100(1 - \alpha)\%$, ya que generalmente solo debe demostrarse que la desviación estándar no es demasiado grande. Un límite superior de confianza $100(1 - \alpha)\%$ para σ es

$$U = S \sqrt{\frac{n-1}{\chi^2_{\alpha;n-1}}} \quad (7)$$

U = un límite superior de confianza $100(1 - \alpha)\%$ para σ
 S = resultados de la Ecuación 4
 n = número de valores de informe
 $\chi^2_{\alpha;n-1}$ = un percentil de una distribución chi cuadrado central con área α a la izquierda y $(n - 1)$ grados de libertad

Por ejemplo, si $\alpha = 0,05$ y $n = 9$, luego $\chi^2_{0,05;8} = 2,73$. Usando los datos en la Tabla 3,

$$U = S \sqrt{\frac{n-1}{\chi^2_{\alpha;n-1}}}$$

$$U = 4,44 \sqrt{\frac{9-1}{2,73}} = 7,60 \text{ mg/g} \quad (8)$$

Los intervalos de confianza en las Ecuaciones 5 y 7 pueden usarse para realizar pruebas estadísticas en función de los criterios incluidos en el protocolo de validación. El uso de estimadores puntuales solamente no provee la exactitud científica requerida. En particular, el intervalo bilateral de confianza en la Ecuación 5 puede usarse para llevar a cabo una prueba unilateral doble (TOST, por sus siglas en inglés) de equivalencia estadística (2). Se puede asumir en este ejemplo que se valida el requisito de exactitud cuando la evidencia demuestra que el valor absoluto de β es no más de 15 mg/g. Dado que el intervalo de confianza calculado de $-9,94$ a $-4,44$ mg/g se encuentra completamente dentro del intervalo de -15 a $+15$ mg/g, se cumple con el criterio de sesgo. Generalmente, la TOST emplea una tasa de error tipo I de $\alpha = 0,05$. Esta tasa de error representa el máximo riesgo de declarar que el criterio de aceptación se cumple, cuando en realidad no se ha cumplido. Entonces, con $\alpha = 0,05$, el intervalo bilateral de confianza en la Ecuación 5 es $100(1 - 2\alpha)\% = 90\%$.

El límite superior en la Ecuación 7 se usa para validar la precisión. Suponer que el criterio de aceptación previamente definido para la precisión requiere que σ sea <20 mg/g. El límite superior calculado de 7,60 mg/g en la Ecuación 8 representa el valor más alto que se puede esperar para σ con una confianza del 95%. Ya que 7,60 mg/g es <20 mg/g, la precisión ha sido validada de manera exitosa con una confianza del 95%.

3.2 Validación Combinada de Exactitud y Precisión

Cuando se evalúa si un procedimiento analítico es adecuado para su propósito previsto, con frecuencia es útil considerar el efecto combinado del sesgo y la precisión. El grado en el cual β afecta la utilidad de un procedimiento analítico depende en

parte de σ . Esto quiere decir que un procedimiento con un valor de σ relativamente pequeño puede acomodar un valor de β relativamente mayor que un procedimiento con un valor de σ mayor. Por esta razón, es útil establecer un criterio único que pueda ser usado de manera simultánea para validar la exactitud y la precisión. Un criterio de este tipo se ha propuesto en una serie de artículos por Hubert y colaboradores. (3-5) y busca asegurar que

$$Pr(-\lambda < Y - \tau < \lambda) \geq P \text{ ó}$$

$$Pr(-\lambda + \tau < Y < \lambda + \tau) \geq P \text{ (9)}$$

- Pr = probabilidad de referencia
- λ = límite aceptable
- Y = un valor de informe
- τ = valor de referencia verdadero o aceptado
- P = valor de probabilidad deseado

La Ecuación 9 tiene una interpretación dual. Se puede interpretar como (i) la probabilidad de que el valor de informe siguiente esté en el intervalo de $(-\lambda + \tau)$ a $(\lambda + \tau)$ es $\geq P$ o como (ii) la probabilidad de que todos los valores de informe futuros estén entre $(-\lambda + \tau)$ y $(\lambda + \tau)$ es $\geq P$. Por lo tanto, se proponen dos intervalos estadísticos para demostrar que la Ecuación 9 es verdadera:

1. Un intervalo de predicción (también conocido como un intervalo de tolerancia esperado) se usa para demostrar (i).
2. Un intervalo de tolerancia (también conocido como un intervalo de tolerancia de contenido) se usa para demostrar (ii).

Hahn y Meeker (6) observan que el intervalo de predicción también se conoce como un intervalo de tolerancia esperado y el intervalo de tolerancia también se conoce como un intervalo de tolerancia de contenido. Ya que la inferencia asociada con el intervalo de tolerancia afecta a un grupo mayor de valores, el intervalo de tolerancia es siempre más amplio que el intervalo de predicción. La elección de un intervalo dependerá de la intención de validar (ERR 01-may-2018) (i) o (ii) y el perfil de riesgos de una empresa.

Cualquier intervalo puede usarse de la siguiente manera para evaluar la exactitud y la precisión de manera simultánea mediante la Ecuación 9.

1. Calcular el intervalo estadístico adecuado usando la Ecuación 10 para el intervalo de predicción y la Ecuación 11 para el intervalo de tolerancia.
2. Si el intervalo calculado se encuentra completamente en el intervalo de $(-\lambda + \tau)$ a $(\lambda + \tau)$, se cumple con el criterio en la Ecuación 9 y se validan tanto la exactitud como la precisión del procedimiento.

El intervalo de predicción usado para validar la Ecuación 9 es

$$\bar{Y} \pm t_{(1+P)/2:n-1} \times S \sqrt{1 + \frac{1}{n}} \quad (10)$$

- \bar{Y} = media de la muestra
- $t_{(1+P)/2:n-1}$ = percentil de una distribución t central con área de $(1 + P)/2$ a la izquierda y $(n - 1)$ grados de libertad
- S = resultados de la Ecuación 4

El intervalo de tolerancia $100(1 - \alpha)\%$ usado para validar la Ecuación 9 es

$$\bar{Y} \pm K \times S$$

$$K = \sqrt{\frac{Z_{(1+P)/2}^2 \times (n-1)}{\chi_{\alpha:n-1}^2}} \times \left(1 + \frac{1}{n}\right) \quad (11)$$

- \bar{Y} = media de la muestra
- K = resultados de la Ecuación 11
- S = resultados de la Ecuación 4
- $Z_{(1+P)/2}^2$ = el cuadrado del percentil normal estándar con área $(1 + P)/2$ a la izquierda
- n = número de valores de informe
- $\chi_{\alpha:n-1}^2$ = un percentil chi cuadrado con área α a la izquierda y $(n - 1)$ grados de libertad

La fórmula para K se basa en una aproximación de Howe (7), aunque se pueden encontrar valores exactos tabulados en diversas fuentes. La aproximación funciona bien en situaciones prácticas si los valores exactos no se encuentran disponibles.

Para los datos en la Tabla 3 con $P = 0,90$, el intervalo para la Ecuación 10 se calcula como

$$\bar{Y} \pm t_{(1+P)/2, n-1} \times S \sqrt{1 + \frac{1}{n}}$$

$$992,81 \pm 1,86 \times 4,44 \sqrt{1 + \frac{1}{9}} \quad (12)$$

$$[984,1 \text{ a } 1001,5] \text{ mg/g}$$

El intervalo para la Ecuación 11 con $1 - \alpha = 0,90$ y $P = 0,90$ es

$$K = \sqrt{\frac{Z_{(1+P)/2}^2 \times (n-1)}{\chi_{\alpha:n-1}^2} \times \left(1 + \frac{1}{n}\right)}$$

$$K = \sqrt{\frac{(1,64)^2 \times (9-1)}{3,49} \times \left(1 + \frac{1}{9}\right)} = 2,63$$

$$\bar{Y} \pm K \times S$$

$$992,81 \pm 2,63 \times 4,44$$

$$[981,2 \text{ a } 1004,5] \text{ mg/g} \quad (13)$$

El valor exacto para K es 2,637 y se observa que la aproximación funciona bastante bien. Según se predijo anteriormente, el intervalo para la Ecuación 13 es más amplio que el intervalo para la Ecuación 12.

Suponer que el criterio para la Ecuación 9 está diseñado para asegurar que la diferencia entre Y y τ sea $<2\%$ de τ con una probabilidad de no menos de $P = 0,90$. Entonces,

$$-\lambda + \tau = \tau(-0,02 + 1) = 1000(0,98) = 980 \text{ mg/g}$$

$$\tau + \lambda = \tau(1 + 0,02) = 1000(1,02) = 1020 \text{ mg/g} \quad (14)$$

Dado que ambas Ecuaciones 12 y 13 se encuentran en el intervalo de 980 a 1020 mg/g, el procedimiento se valida usando cualquiera de los dos intervalos.

También es posible estimar $Pr(-\lambda < Y - \tau < \lambda)$ en la Ecuación 9 usando directamente el intervalo de confianza descrito por Mee (8) o un enfoque bayesiano. Se cumple con el criterio de validación si esta probabilidad estimada excede P . Se provee un intervalo de tolerancia bayesiana en Wolfinger (9) y puede ser calculado usando un paquete de software para estadística WinBUGS (10,11). Los análisis bayesianos pueden ser difíciles y se recomienda la ayuda de un estadístico experto.

4. LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN

El límite de detección (LOD, por sus siglas en inglés) y el límite de cuantificación (LOQ, por sus siglas en inglés) son dos cantidades relacionadas determinadas en la validación de procedimientos de Categoría II en el capítulo <1225>. Estos son procedimientos para la determinación de impurezas o productos de degradación en fármacos y productos farmacéuticos terminados. Se requiere solo uno para cada uso: LOQ para pruebas cuantitativas y LOD para pruebas de límite cualitativas. Estos límites también se conocen con otros nombres, incluido DL, por sus siglas en inglés, para LOD y límite inferior de cuantificación (LLOQ) para LOQ.

Las definiciones siguientes son consistentes con el capítulo <1225> y las pautas ICH Q2:

- El límite de detección es la cantidad mínima de analito que puede detectarse en una muestra, aunque no necesariamente cuantificarse, en las condiciones experimentales indicadas.
- El límite de cuantificación es la mínima cantidad de analito en una muestra que se puede determinar con precisión y exactitud aceptables en las condiciones experimentales indicadas.

Los valores candidatos para el límite de detección o el límite de cuantificación pueden evaluarse durante la prevalidación o basándose en una evaluación de riesgo. Los valores candidatos deben, entonces, verificarse. Esto es de particular importancia para el límite de cuantificación, ya que las fórmulas para determinar los valores candidatos no tienen en cuenta el requisito de exactitud y precisión aceptables. La verificación de los valores candidatos se realiza como parte del protocolo de validación.

4.1 Estimación del límite de detección

El enfoque básico para estimar el límite de detección se basa en una definición alternativa adoptada por la International Union of Pure and Applied Chemistry (Unión Internacional de Química Pura y Aplicada o IUPAC) y la International Organization for Standardization (Organización Internacional para la Estandarización o ISO). Esta definición presenta la noción de decisiones basadas en falsos positivos y falsos negativos, y por lo tanto reconoce elementos de riesgo al usar el límite de detección en la toma de decisiones. La definición aclara que estos valores dependen de la capacidad del laboratorio.

La definición IUPAC/ISO de límite de detección se basa en el concepto subyacente de un valor crítico (R_C), que se define como la lectura de la señal excedida con probabilidad α cuando no se encuentra presente ningún analito. Esto es,

$$R_C = B + Z_{1-\alpha}\sigma_E \quad (15)$$

- R_C = lectura de la señal excedida con probabilidad α cuando no se encuentra presente ningún analito
 B = media estimada para las lecturas de los blancos
 $Z_{1-\alpha}$ = un cuantil normal estándar con área $1 - \alpha$ a la izquierda
 σ_E = desviación verdadera de la repetibilidad

La *Figura 1* presenta esta relación gráficamente.

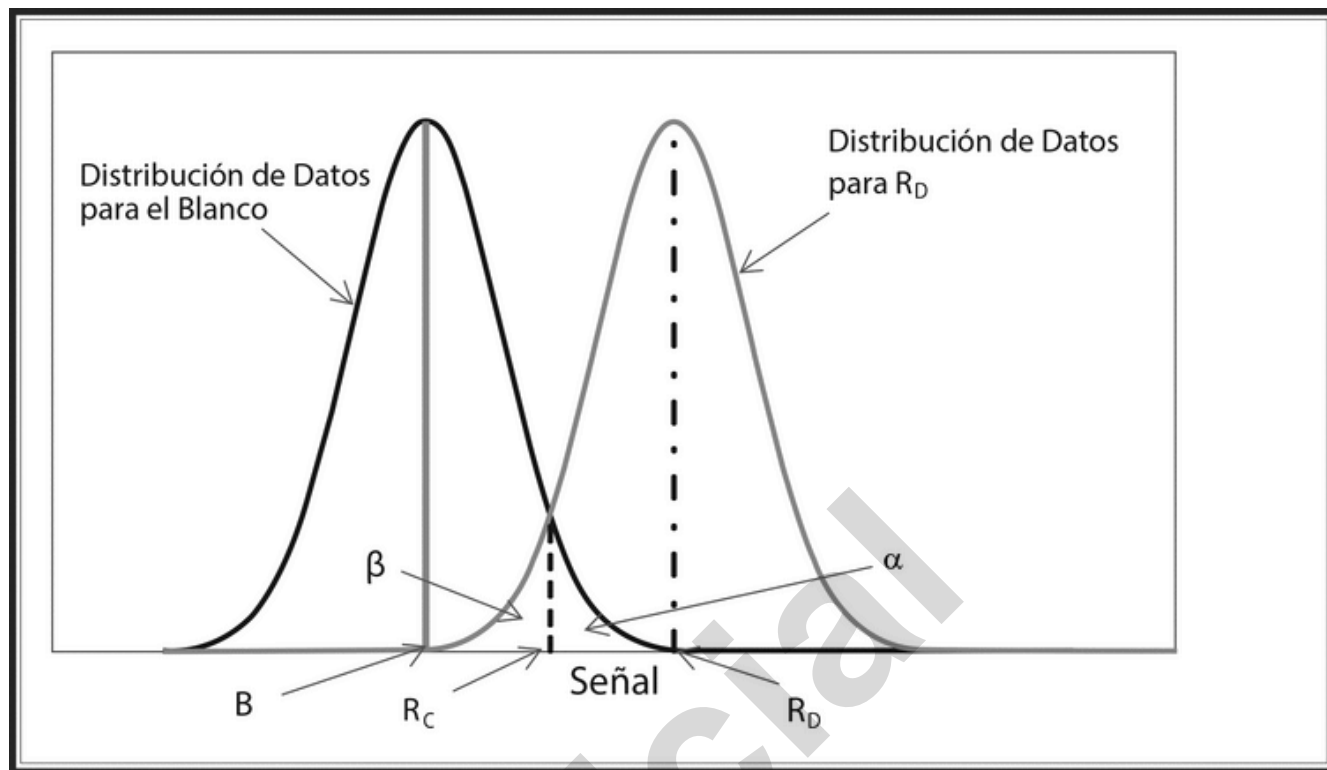


Figura 1. Determinación de R_C y R_D .

Por ejemplo, si $\alpha = 0,05$; $1 - \alpha = 0,95$ y $Z_{0,95} = 1,645$. Esta determinación depende de la distribución de valores obtenidos cuando se analizan blancos. El límite de detección en el espacio de la señal (R_D) se define como el valor, que de ser verdadero, es tal que R_C es excedido con probabilidad $1 - \beta$. Esto es,

$$R_D = R_C + Z_{1-\beta}\sigma_E \quad (16)$$

- R_D = límite de detección en el espacio de la señal
- R_C = valor crítico usando la definición IUPAC/ISO de límite de detección
- $Z_{1-\beta}$ = cuantil normal estándar con área $1 - \beta$ a la izquierda
- σ_E = desviación verdadera de la repetibilidad

Resolviendo las Ecuaciones 15 y 16 para R_D , tenemos

$$R_D = B + (Z_{1-\alpha} + Z_{1-\beta})\sigma_E \quad (17)$$

- R_D = límite de detección en el espacio de la señal
- B = media estimada para la lectura de los blancos
- $Z_{1-\alpha}$ = un cuantil normal estándar con área $1 - \alpha$ a la izquierda
- $Z_{1-\beta}$ = un cuantil normal estándar con área $1 - \beta$ a la izquierda
- σ_E = desviación verdadera de la repetibilidad

Se debe tener en cuenta que esta definición le permite al laboratorio seleccionar dos valores: α y β (que no necesitan ser iguales). α representa la probabilidad de error tipo I o tasa de error de falso positivo y β representa la probabilidad de error tipo II o tasa de error de falso negativo. En la Figura 1, R_C y R_D se ilustran con $\alpha = \beta = 0,05$ para datos distribuidos normalmente de manera que $Z_{1-\alpha} = Z_{1-\beta} = 1,645$. Si bien los valores de α y β no necesitan ser iguales, esta elección conduce a una regla común para R_D , específicamente $B + 3,3\sigma_E$ ($3,3 \cong 2 \times 1,645$).

El límite de detección en la escala de concentración se encuentra mediante la conversión del valor en la escala de señal, R_D , a uno en la escala de concentración, LOD, según se muestra en la Figura 2.

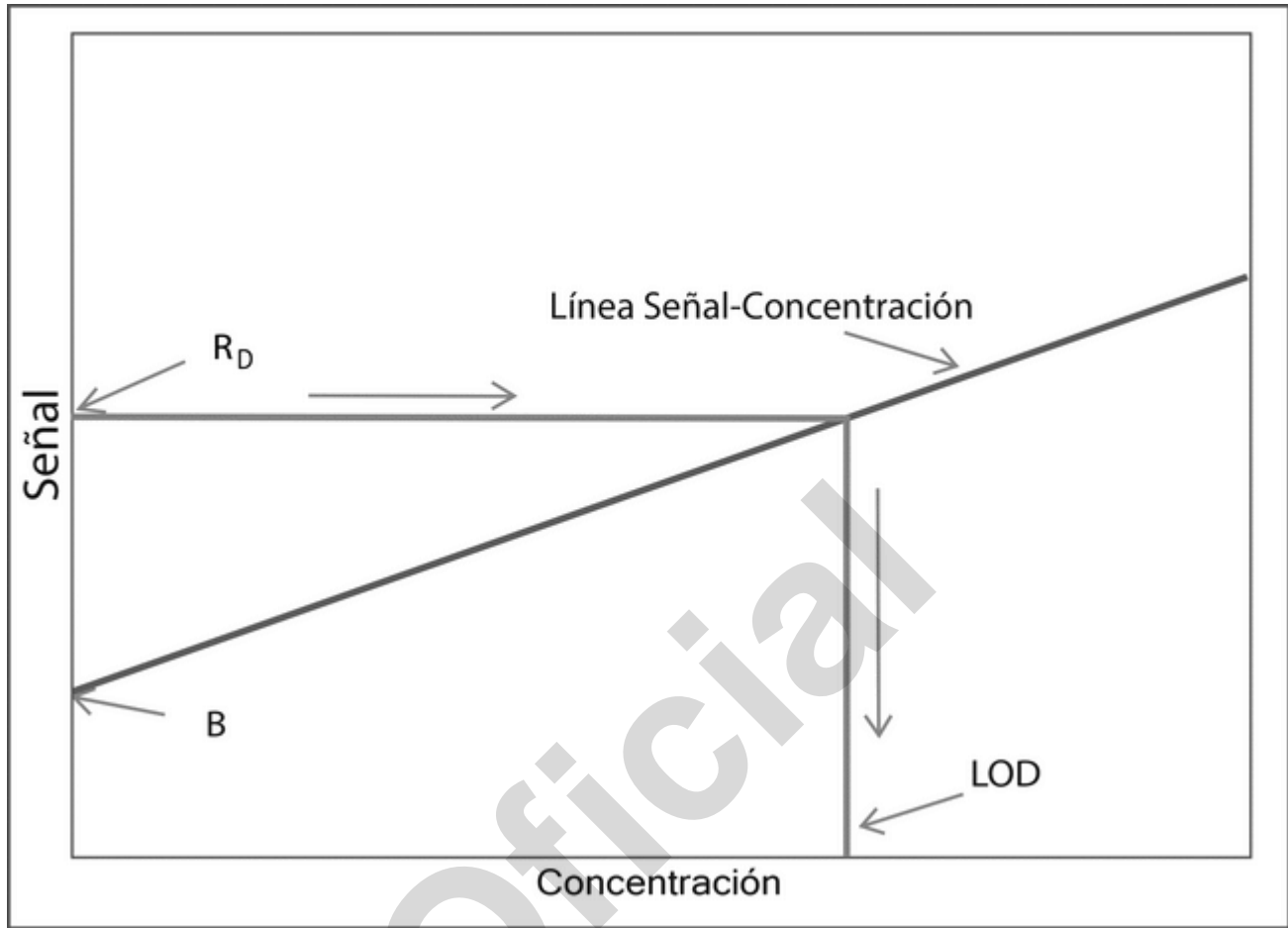


Figura 2. Determinación del límite de detección a partir de R_D .

Este paso requiere que la línea de la señal (R) en función de la concentración (X), $R = B + mX$, al igual que σ_E , se conozcan con exactitud. La formulación provista en esta sección asume que las mediciones de regresión son independientes.

El límite de detección en la escala de concentración se calcula entonces como

$$LOD = \frac{R_D - B}{m} = \frac{(Z_{1-\alpha} + Z_{1-\beta})\sigma_E}{m} \quad (18)$$

- LOD = límite de detección
- R_D = límite de detección en el espacio de la señal
- B = media estimada para las lecturas de los blancos
- $Z_{1-\alpha}$ = cuantil normal estándar con área $1 - \alpha$ a la izquierda
- $Z_{1-\beta}$ = cuantil normal estándar con área $1 - \beta$ a la izquierda
- σ_E = desviación verdadera de la repetibilidad
- m = pendiente

La definición de límite de detección en la *Ecuación 18* no es satisfactoria como procedimiento estadístico por dos razones. Primero, dado que σ_E es generalmente un valor desconocido, debe determinarse cómo estimar de la mejor manera este parámetro. Esto es complicado ya que σ_E depende típicamente de la concentración. Dos estimados comunes son (i) la desviación estándar de las respuestas del blanco y (ii) la desviación estándar obtenida de las desviaciones alrededor de la línea de regresión de la señal para la concentración. La elección debe ser el valor que mejor representa σ_E alrededor del límite de detección. Los laboratorios con frecuencia seleccionan un valor del peor caso para σ_E . Si el límite de detección sigue siendo adecuado para su uso previsto, los laboratorios se encuentran protegidos ante una subestimación del límite de detección. Subestimar los resultados del límite de detección resulta en una tasa de error tipo II (β) sobrevaluada y una tasa de error tipo I (α) subvaluada.

El segundo problema estadístico de la *Ecuación 18* es cómo incorporar la incertidumbre debida al hecho de que se desconoce la pendiente exacta de la línea de regresión de la señal para la concentración. Ya que la línea de regresión es estimada, la definición de R_D en la *Ecuación 17* es, en sí misma, un estimado. Esto se corrige usando un intervalo de predicción estadística que tenga en cuenta la incertidumbre en la línea estimada, al igual que la variabilidad asociada con una observación futura. La fórmula ampliada para el valor crítico, R_C , definido originalmente en la *Ecuación 15* y que tiene en cuenta esta incertidumbre es

$$R_C = B + t_{1-\alpha;n-2} \times S \sqrt{1 + \frac{1}{n} + \frac{\bar{X}^2}{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}} \quad (19)$$

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (R_i - B - mX_i)^2}{n-2}}$$

- R_C = valor crítico usando la definición IUPAC/ISO de límite de detección
- B = ordenada de la línea de calibración ajustada
- $t_{1-\alpha;n-2}$ = percentil de una distribución t central con área de $1 - \alpha$ a la izquierda y $(n - 2)$ grados de libertad
- S = error estándar de la línea de regresión
- \bar{X} = concentración promedio
- n = número de observaciones usadas en el análisis de regresión
- X_i = valor de concentración usado para determinar la línea
- R_i = intervalo de referencia
- m = pendiente

La *Ecuación 19* difiere de la *Ecuación 15*, ya que se usa la distribución t en lugar de la distribución normal para el multiplicador y aparecen dos términos adicionales en la raíz cuadrada para capturar la incertidumbre de la línea de regresión.

Una segunda ecuación para R_C responde a la pregunta: "¿Por encima de qué nivel de concentración podemos estar seguros de que obtendremos señales que se puedan diferenciar del fondo?" Esta pregunta se responde usando el límite inferior de predicción $100(1 - \beta)\%$ de la curva de calibración, según se muestra en la *Figura 3*.

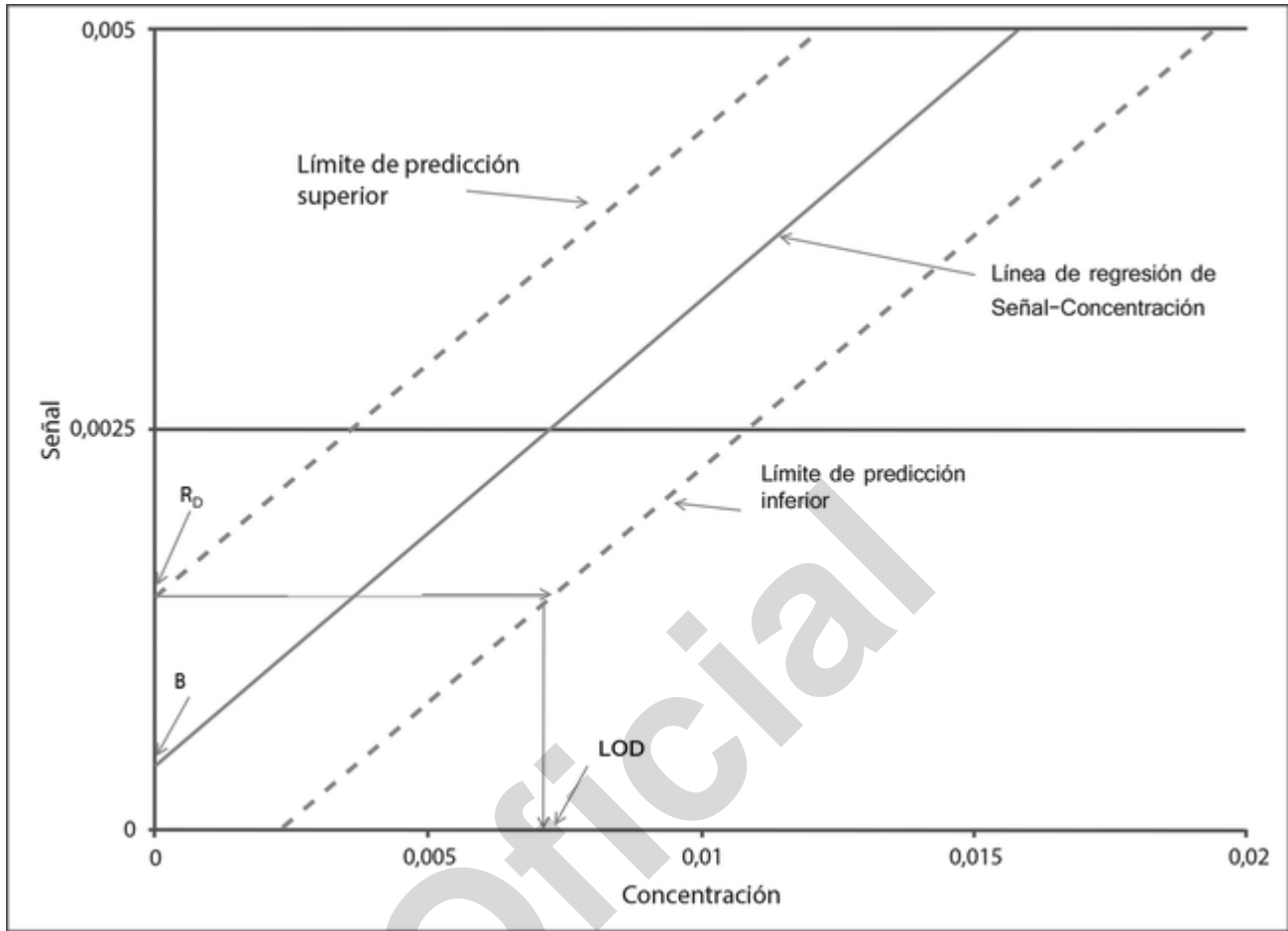


Figura 3. Determinación del límite de detección usando límites de predicción.

La Figura 3 es similar a la Figura 2, pero usa dos líneas de puntos en lugar de una línea de calibración continua. Aquí

$$R_C = B + LOD \times m - t_{1-\beta;n-2} \times S \sqrt{1 + \frac{1}{n} + \frac{(LOD - \bar{X})^2}{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}} \quad (20)$$

- R_C = valor crítico usando la definición IUPAC/ISO de límite de detección
- B = ordenada estimada de la línea de calibración ajustada
- LOD = límite de detección
- m = pendiente
- $t_{1-\beta;n-2}$ = percentil de una distribución t central con área de $1 - \beta$ a la izquierda y $(n - 2)$ grados de libertad
- S = error estándar de la línea de regresión
- \bar{X} = valor de concentración promedio cuadrado
- n = número de observaciones usadas en el análisis de regresión
- X_i = valor de concentración usado para determinar la línea

Después de igualar la Ecuación 19 y la Ecuación 20, y cancelar los términos B ,

$$t_{1-\alpha;n-2} \times S \sqrt{1 + \frac{1}{n} + \frac{\bar{X}^2}{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}} = LOD \times m - t_{1-\beta;n-2} \times S \sqrt{1 + \frac{1}{n} + \frac{(LOD - \bar{X})^2}{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}} \quad (21)$$

$t_{1-\alpha;n-2}$ = percentil de una distribución t central con área de $1 - \alpha$ a la izquierda y $(n - 2)$ grados de libertad

- S = error estándar de la línea de regresión
- \bar{X}^2 = valor de concentración promedio cuadrado
- LOD = límite de detección
- m = pendiente
- $t_{1-\alpha;n-2}$ = percentil de una distribución t central con área de $1 - \alpha$ a la izquierda y $(n - 2)$ grados de libertad
- n = número de observaciones usadas en el análisis de regresión
- X_i = valor de concentración usado para determinar la línea
- \bar{X} = valor de concentración promedio

La Ecuación 21 es una ecuación cuadrática para el límite de detección que puede resolverse de manera exacta o usando herramientas de búsqueda iterativa disponibles en las hojas de cálculo. Una aproximación (que sobreestima) ligeramente conservadora para el límite de detección que no requiere una solución cuadrática se obtiene asumiendo que el límite de detección es insignificante en comparación con \bar{X} [es decir, $(LOD - \bar{X})^2$ se reemplaza con \bar{X}^2]. La ecuación resultante de esta simplificación es

$$LOD = (t_{1-\alpha;n-2} + t_{1-\beta;n-2}) \times \frac{S}{m} \sqrt{1 + \frac{1}{n} + \frac{\bar{X}^2}{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}} \quad (22)$$

- LOD = límite de detección
- $t_{1-\alpha;n-2}$ = percentil de una distribución t central con área de $1 - \alpha$ a la izquierda y $(n - 2)$ grados de libertad
- $t_{1-\beta;n-2}$ = percentil de una distribución t central con área de $1 - \beta$ a la izquierda y $(n - 2)$ grados de libertad
- S = error estándar de la línea de regresión
- \bar{X} = valor de concentración promedio
- m = pendiente
- n = número de observaciones usadas en el análisis de regresión
- X_i = valor de concentración usado para determinar la línea

que es similar en forma a la Ecuación 18. Las Ecuaciones 18 y 22 permiten que las dos probabilidades de error, α y β , difieran. Con frecuencia se asume que las dos son iguales a 0,05.

Los datos en la Tabla 4 se usan para demostrar el cálculo del límite de detección.

Tabla 4. Datos para el Ejemplo de Límite de Detección

Concentración X (mg/mL)	Área (señal)
0,01	0,00331
0,02	0,00602
0,05	0,01547
0,10	0,03078
0,15	0,04576
0,25	0,07592

Usando estos datos se obtiene un línea de regresión:

$$\text{Área} = 0,000235 + 0,3032 \times \text{Concentración} \quad (23)$$

de manera que $m = 0,3032$ y $B = 0,000235$. Los valores necesarios para calcular el límite de detección que se muestran en la Ecuación 22 con $\alpha = \beta = 0,05$ se proveen en la Tabla 5.

Tabla 5. Datos Estadísticos Requeridos para Calcular el Límite de Detección en Unidades de Concentración

Estadísticos	Valor
n	6
m (pendiente)	0,3032
S	0,00019
$t_{1-\alpha;n-2} = t_{0,95;4}$	2,132
$t_{1-\beta;n-2} = t_{0,95;4}$	2,132
\bar{X}	0,0967

Tabla 5. Datos Estadísticos Requeridos para Calcular el Límite de Detección en Unidades de Concentración (continuación)

Estadísticos	Valor
$\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2$	0,0419

El valor de límite de detección calculado a partir de la Ecuación 22 es

$$\begin{aligned}
 LOD &= (t_{1-\alpha;n-2} + t_{1-\beta;n-2}) \times \frac{S}{m} \sqrt{1 + \frac{1}{n} + \frac{\bar{X}^2}{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}} \\
 LOD &= (2,132 + 2,132) \times \frac{0,00019}{0,3032} \sqrt{1 + \frac{1}{6} + \frac{0,0967^2}{0,0419}} \\
 LOD &= 0,0032 \text{ mg/mL}
 \end{aligned} \tag{24}$$

- LOD = límite de detección
- $t_{1-\alpha;n-2}$ = percentil de una distribución *t* central con un área de $1 - \alpha$ a la izquierda y $(n - 2)$ grados de libertad
- $t_{1-\beta;n-2}$ = percentil de una distribución *t* central con un área de $1 - \beta$ a la izquierda y $(n - 2)$ grados de libertad
- $\frac{S}{m}$ = error estándar residual de la Ecuación 4
- \bar{X}^2 = concentración promedio cuadrada
- m* = pendiente
- n* = número de observaciones usadas en el análisis de regresión
- X_i = valor de concentración usado para determinar la línea

4.2 Estimación del límite de cuantificación

Tal como se discutió anteriormente, la consideración principal al determinar el límite de cuantificación es la estimación del tipo de límite de cuantificación que se requiere, basándose en su uso previsto. La validación se diseña para validar la exactitud y precisión alrededor del límite de cuantificación requerido.

Si no se tiene esta información o si el laboratorio quiere determinar qué tan bajo puede llegar a ser el límite de cuantificación (p. ej., para otros usos posibles), el laboratorio debe entonces comenzar con potenciales valores de límite de cuantificación mayores, pero cercanos al límite de detección. Como alternativa, los métodos para determinar el límite de detección pueden adaptarse al límite de cuantificación como valores candidatos iniciales. Esencialmente, la fórmula usada para calcular el límite de detección en la Ecuación 22 puede usarse para calcular el límite de cuantificación reemplazando $(t_{1-\alpha;n-2} + t_{1-\beta;n-2})$ con 10. Si se justifica, pueden usarse valores diferentes de 10. Una vez se obtienen los valores candidatos (generalmente durante la prevalidación), la exactitud y precisión se validan considerando estos valores.

Todos los métodos presentados en esta sección se basan en dos suposiciones: la linealidad y la homogeneidad de la varianza a lo largo del rango de concentraciones usado en la determinación de la curva de calibración. Ninguno de estos supuestos es una condición necesaria. La curva de calibración puede ser no lineal y se puede usar un enfoque de mínimos cuadrados ponderados para ajustar por la falta de homogeneidad. Si la curva es no lineal o las varianzas de la concentración difieren significativamente en el rango del límite de detección y el límite de cuantificación, es aconsejable buscar ayuda estadística profesional para definir estos límites. Si existe variabilidad en la línea recta, pero no es significativa, una regresión no ponderada de la curva de calibración proveerá una variabilidad promedio que puede ser usada en las fórmulas para el límite de detección y el límite de cuantificación.

Procedimientos diferentes a los descritos anteriormente, tales como relaciones señal-ruido, pueden usarse para estimar el límite de detección y el límite de cuantificación. En cualquier caso, los analistas deben considerar estos valores como preliminares y verificarlos, en particular si se encuentran por debajo de los valores de concentración usados en la determinación de la curva de calibración. La verificación incluye analizar muestras con concentraciones cercanas al límite de detección y al límite de cuantificación preliminares. Se debe tener en cuenta qué tan bajos deben ser estos límites para que el procedimiento sea adecuado. Por ejemplo, si ya se encuentran disponibles datos a un nivel por debajo del límite de detección requerido y se detecta una señal a un valor más bajo, entonces el valor más bajo puede tomarse como un límite de detección verificado. Existe poco beneficio en una verificación adicional — teniendo en cuenta el requisito vigente. Podría haber un beneficio en la verificación de un valor más bajo en caso de que el requisito cambie.

5. COMENTARIOS FINALES

Este capítulo presenta algunos métodos estadísticos simples que pueden usarse en la validación de un procedimiento según se describe en el capítulo (1225). Estos métodos no pueden aplicarse en todos los casos y otros enfoques estadísticos, más y menos sofisticados, pueden ser adecuados para cualquier situación particular.

Se debe considerar volver a evaluar un procedimiento cada vez que el uso de este cambie. La revalidación es generalmente apropiada cuando, por ejemplo, se emplea una concentración nueva del producto, el procedimiento se transfiere a un laboratorio nuevo, las muestras deben analizarse de conformidad con un tipo nuevo de prueba de estrés o las especificaciones cambien. En algunas situaciones, es suficiente con volver a evaluar los datos existentes para los límites de aceptación revisados.

Finalmente, si bien no es parte de la validación del procedimiento, se recomienda el uso de algún tipo de proceso de control estadístico para monitorear el desempeño del procedimiento. Este tipo de proceso provee una detección temprana de las "variaciones" en las características del desempeño analítico de exactitud y precisión. Tales cambios en el desempeño no son poco comunes y ocurren con frecuencia como resultado del desgaste del equipo, cambio de rutinas o reactivos envejecidos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Weitzel MLJ. The estimation and use of measurement uncertainty for a drug substance test procedure validated according to USP (1225). *Accred Qual Assur.* 2012;17:139–146.
2. Schuirmann DJ. A comparison of the two one-sided tests procedure and the power approach for assessing the equivalence of average bioavailability. *J Biopharmacokinet Biopharmaceut.* 1987;15:657–680.
3. Hubert P, Nguyen-Huu JJ, Boulanger B, Chapuzet E, Chiap P, Cohen N, et al. Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures. A SFSTP proposal—part I. *J Pharm Biomed Anal.* 2004;36(3):579–586.
4. Hubert P, Nguyen-Huu JJ, Boulanger B, Chapuzet E, Chiap P, Cohen N, et al. Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures. A SFSTP proposal—part II. *J Pharm Biomed Anal.* 2007;45(1):70–81.
5. Hubert P, Nguyen-Huu JJ, Boulanger B, Chapuzet E, Chiap P, Cohen N, et al. Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures. A SFSTP proposal—part III. *J Pharm Biomed Anal.* 2007;45(1):82–96.
6. Hahn GJ, Meeker WQ. *Statistical Intervals: A Guide for Practitioners.* New York: John Wiley & Sons; 1991.
7. Howe WG. Two-sided tolerance limits for normal populations—Some improvements. *J Am Stat Assoc.* 1969;64(326):610–620.
8. Mee RW. Estimation of the percentage of a normal distribution lying outside a specified interval. *Commun Stat Theory Methods.* 1988;17(5):1465–1479.
9. Wolfinger RD. Tolerance intervals for variance component models using Bayesian simulation. *J Qual Technol.* 1998;30(1):18–32.
10. Ntzoufras I. *Bayesian Modeling Using WinBUGS.* New York: John Wiley & Sons; 2009.
11. Spiegelhalter D, Thomas A, Best N, Gilks W. *BUGS 0.5 Examples: Volume 1 (version i).* Cambridge, UK: MRC Biostatistics Unit; 1996.