



UNIVERSITAT
ROVIRA I VIRGILI



s.p.[®] veterinaria

OPTIMITZACIÓ I VALIDACIÓ D'UN MÈTODE D'ANÀLISI PER A UNA ESPECIALITAT FARMACÈUTICA

TREBALL DE FI DE GRAU

Jennifer Lozano Castro

dirigit per

la tutora de l'empresa: Dra. Laura Trabalón

la tutora acadèmica: Dra. Míriam Díaz de los Bernardos

realitzat a

S.P. Veterinaria

Grau en Química

Tarragona

2021

Optimització i validació d'un mètode d'anàlisi per a una especialitat farmacèutica

CONTINGUTS

▪ Resum	2
▪ <i>Abstract</i>	2
1 Objectius.....	3
2 Introducció	4
2.1 Cromatografia HPLC i UHPLC.....	4
2.2 Fonaments de la validació d'un mètode analític per a una especialitat farmacèutica.....	5
3 Part experimental.....	9
3.1 Mètode analític	9
3.2 Optimització del mètode analític	13
3.3 Validació del mètode analític	14
3.4 Anàlisi de mostres de l'especialitat farmacèutica	18
4 Resultats i discussió	19
4.1 Càlculs generals	19
4.2 Criteris d'acceptació	21
4.3 Optimització del mètode analític	21
4.4 Validació del mètode analític	23
4.5 Anàlisi de mostres de l'especialitat farmacèutica	34
5 Conclusions	35
6 <i>Conclusions</i>	35
7 Bibliografia.....	36

AGRAÏMENTS

Vull donar les gràcies a tot l'equip de S.P. Veterinaria per haver-me donat la oportunitat de fer aquest treball a la vostra empresa, per acollir-me i ajudar-me en tot el que he necessitat.

També vull donar les gràcies a la meva tutora, Laura Trabalón, pel tracte immillorable que he rebut per part seva, per la paciència i dedicació que ha invertit en ensenyar-me, en ajudar-me a millorar i en guiar-me en la realització d'aquest treball i durant tot el període de pràctiques. He après moltíssim amb tu, gràcies.

Agraeixo a la meva tutora acadèmica haver resolt tots els meus dubtes i per les correccions i els comentaris aportats.

Quiero dar las gracias a la familia y los amigos que me han apoyado siempre, en especial a mi madre, por todos los sacrificios que has hecho para traerme hasta aquí, por no rendirte nunca y por creer siempre en mí. Por último, agradezco a mi pareja su apoyo incondicional durante estos años y por haber estado presente siempre que lo he necesitado.

▪ **RESUM**

En l'actualitat, l'ús de productes farmacèutics en animals domèstics i de granja està àmpliament estès. Per garantir que aquests fàrmacs compleixen les especificacions requerides és indispensable que passin un procés de control de la qualitat i analitzar-los segons els protocols i mètodes analítics corresponents. Per confirmar que aquests mètodes analítics són adequats i fiables és necessari validar-los.

En aquest treball de fi de grau s'ha validat un mètode d'anàlisi d'una especialitat farmacèutica mitjançant la cromatografia de líquids d'ultra alta resolució. En el transcurs de la validació s'han avaluat diferents paràmetres del mètode analític com la selectivitat, la linealitat, el rang, l'exactitud, la precisió, la robustesa i l'estabilitat. Per a avaluar aquests paràmetres s'ha analitzat un conjunt de mostres en condicions d'anàlisi concretes i, posteriorment, s'han aplicat diversos tests estadístics als resultats experimentals per avaluar cada paràmetre segons les seves especificacions. Per últim s'ha analitzat mostra real del producte farmacèutic.

▪ **ABSTRACT**

Nowadays, the use of pharmaceuticals in domestic and farm animals is long-established. Putting them through a quality control process and analyse them in agreement with the required protocols and analytical methods is essential to ensure that they meet the required specifications. to confirm that these analytical methods are adequate and reliable is necessary to validate them.

In this project, a pharmaceutical speciality analytical method was validated by Ultra High-Resolution Liquid Chromatography. Through this validation, different analytical method parameters such as selectivity, linearity, range, accuracy, precision, robustness, and stability were evaluated. A set of samples under specific analysis conditions was analysed to evaluate these parameters. Afterwards, to evaluate each parameter according to its specifications several statistical tests were applied to the experimental results. Finally, a real sample of the pharmaceutical product was analysed.

1 OBJECTIUS

L'objectiu principal d'aquest treball de final de grau és optimitzar i validar un mètode analític per una especialitat farmacèutica mitjançant la cromatografia de líquids d'alta resolució. Per assolir aquest objectiu, s'han d'avaluar diferents paràmetres del mètode, com ara la selectivitat, la linealitat, el rang, l'exactitud, la precisió, la robustesa i l'estabilitat.

Per avaluar aquests paràmetres, és necessari fer una sèrie de diferents anàlisis variant el número i concentració de mostres amb l'objectiu d'obtenir els resultats necessaris per poder realitzar els tests estadístics propis per a cada paràmetre. L'objectiu últim d'aquest treball és obtenir uns resultats estadístics que es trobin dins dels criteris d'acceptació establerts i especificats a la bibliografia i, d'aquesta manera, poder donar el mètode analític per validat.

2 INTRODUCCIÓ

S.P. Veterinaria és un laboratori farmacèutic ubicat a Riudoms (Tarragona) i es dedica al desenvolupament, fabricació i comercialització de productes d'ús veterinari i ramader. Aquesta empresa té més de 50 anys d'experiència, exporta a més de 40 països i disposa d'un dels vademècums més amplis del sector. A més, està autoritzat per la Agència Espanyola del Medicament i compta amb el certificat de Normes de Correcta Fabricació (GMPs) que garanteix la qualitat, seguretat i eficàcia dels seus productes¹.

Dins del departament de control de la qualitat de S.P. Veterinaria es troben els departaments de matèria prima, producte acabat, microbiologia i cromatografia i, dins d'aquest últim, es troba el subdepartament de desenvolupament analític, en el qual s'ha realitzat aquest treball de fi de grau.

2.1 Cromatografia HPLC i UHPLC

La cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC) és una tècnica analítica que permet la separació, identificació i quantificació de diferents analits presents a una mateixa mostra. Aquesta tècnica proporciona un cromatograma amb pics cromatogràfics que s'assignen als analits en funció del seu temps de retenció. L'àrea dels pics és proporcional a la concentració injectada d'analits².

Un equip d'HPLC es compon d'un depòsit per la fase mòbil, un desgasificador, una bomba, un sistema d'injecció manual o automàtic, una columna cromatogràfica, un detector i un sistema d'adquisició de dades².

Amb la cromatografia de líquids d'ultra alta resolució (UHPLC) es treballa a pressions més elevades que amb HPLC i s'utilitzen columnes amb partícules de nucli sòlid o columnes amb una mida de partícula més petita (fins a 2 µl), el que permet fer anàlisis amb alta resolució i eficàcia, reduir el temps d'anàlisi i l'ús de solvent³.

2.2 Fonaments de la validació d'un mètode analític per a una especialitat farmacèutica

El treball analític té un gran impacte en la societat i, en cas d'errors, els costos poden ser molt elevats. Per tant, és essencial poder mesurar adequadament i demostrar que els resultats són correctes. Mitjançant les validacions del mètode analític, es pot demostrar que un mètode és adequat pel seu ús previst⁴.

Validar és confirmar el compliment de requisits concrets per un ús específic previst mitjançant exàmens i aportant evidències objectives⁵ o, dit d'una altra forma, l'obtenció de proves o evidència documental de que un equip, material, activitat, sistema o procediment analític permet obtenir els resultats previstos, precisos, exactes, dintre de les especificacions i amb els atributs de qualitat establerts prèviament. Per poder validar un mètode és necessari conèixer l'analit i les seves característiques, que la formulació del producte sigui definitiva i que l'analista estigui familiaritzat amb el mètode⁶.

Existeixen diferents motius per els que un mètode d'anàlisi d'un producte farmacèutic s'ha de validar:

- Necessitat de proves documentals que demostrin que els mètodes són adequats per a portar a terme les anàlisis proposats amb les condicions establertes.
- Necessitat de treballar amb mètodes fiables i robustos per minimitzar errors i costos.
- Necessitat de complir les exigències legals del registre d'especialitats farmacèutiques i de les Bones Pràctiques de Laboratori⁶.

També hi ha diferents tipus d'aplicacions analítiques per les que un mètode pot ser validat:

- Assaig per identificar substàncies i principis actius.
- Assaig per determinar l'analit d'interès d'una matèria prima o especialitat farmacèutica, que és el cas de la validació portada a terme en aquest treball.
- Assaig per determinar les característiques inherents d'un producte.
- Assaig per determinar impureses i substàncies relacionades.
- Assaig per determinar analits en mostres biològiques.
- Assaig microbiològic⁶.

Optimització i validació d'un mètode d'anàlisi per a una especialitat farmacèutica

El desenvolupament típic d'un mètode analític transcorre en diferents fases:

- Definició de les condicions necessàries per a dur a terme el desenvolupament analític, com serien els costos, temps disponible, condicions de seguretat, equip i instrumentació necessaris, etc.
- Optimització mitjançant estudis previs de tanteig de patró i mostres reals utilitzant el mètode analític per garantir el bon funcionament del sistema.
- Estudis d'estabilitat de la mostra per l'anàlisi i estudi de les característiques d'idoneïtat mitjançant l'estudi de la robustesa, per conèixer els valors crítics dels paràmetres del mètode. Aquests estudis es portaran a terme junt amb l'estudi dels paràmetres de validació.
- Coneixement de les característiques de fiabilitat del mètode per poder aplicar-lo de forma rutinària. Aquestes característiques demostren la capacitat del mètode analític de mantenir els criteris de validació al llarg del temps i engloben tots els paràmetres de validació. Els paràmetres són la selectivitat, la linealitat, la precisió, l'exactitud i el límit de quantificació i de detecció⁶. La necessitat d'avaluar uns paràmetres o uns altres dependrà del tipus de mètode, tal i com s'exposa a la *Taula 1*. Aquest treball es centrarà especialment en aquest últim punt i, donat que es desitja determinar l'analit d'interès d'una especialitat farmacèutica (columna marcada en color groc a la *Taula 1*), s'estudiarà l'exactitud, la precisió, la linealitat, el rang, la selectivitat, l'estabilitat i la robustesa⁷.

Taula 1. Paràmetres de validació segons el tipus d'aplicació analítica⁷.

Paràmetres de validació	Tipus d'aplicacions analítiques			
	Assaig d'identificació	Assaig de quantificació d'impureses	Assaig per conèixer el límit d'impureses	Assaig per quantificar l'analit d'interès d'una matèria prima o especialitat farmacèutica
Exactitud	No	Si	No	Si
Precisió	No	Si	No	Si
Selectivitat	Si	Si	Si	Si
Límit de detecció	No	No	Si	No
Límit de quantificació	No	Si	No	No
Linealitat	No	Si	No	Si
Rang	No	Si	No	Si

2.2.1 Selectivitat

La selectivitat és la capacitat d'un mètode analític per mesurar i identificar, simultània i/o separadament, els analits de forma inequívoca⁸ fins i tot en presència d'altres substàncies químiques com impureses, productes de degradació o excipients. Aquestes impureses i excipients poden arribar a interferir en la senyal cromatogràfica de l'analit dificultant-ne la identificació o distorsionant la seva resposta analítica⁶.

2.2.2 Linealitat i rang

La linealitat és la capacitat del mètode per donar resultats proporcionals a la concentració de l'analit dins d'un rang, prèviament establert, que és l'interval entre la concentració màxima i mínima en la que el mètode és precís, exacte i lineal⁸.

2.2.3 Exactitud

L'exactitud expressa la proximitat entre el valor de referència (l'acceptat com valor verdader) i el valor experimental⁸, és a dir, la diferència entre el valor obtingut a l'anàlisi i el valor verdader⁶.

2.2.4 Precisió

La precisió expressa el grau de dispersió entre una sèrie de resultats obtinguts analitzant el mateix tipus de mostra i amb les mateixes condicions⁸, és a dir, la capacitat del mètode de proporcionar resultats pròxims entre ells. Estudiant la precisió es pot conèixer la variabilitat del mètode, que pot ser deguda a errors inherents del mètode causats per factors com l'analista, l'equip instrumental, els reactius o el temps⁶. En aquest treball no s'estudia la reproductibilitat⁶ però sí la precisió intermèdia i la repetibilitat.

- Repetibilitat: La repetibilitat avalua la variabilitat del mètode analitzant les mateixes mostres sota les mateixes condicions i en un període curt de temps⁸. Per estudiar la repetibilitat és necessari avaluar dos paràmetres diferents; la repetibilitat del sistema instrumental, que estudia la variabilitat deguda a l'instrument i, la repetibilitat del mètode, que estudia la variabilitat deguda a les característiques del mètode⁶.
- Precisió intermèdia: La precisió intermèdia avalua la variabilitat del mètode analitzant les mateixes mostres però no en un mateix dia⁸.

2.2.5 Robustesa

La robustesa és la capacitat del mètode analític de no ser alterat al aplicar petites variacions en els paràmetres d'anàlisi i aporta fiabilitat a l'estabilitat del mètode durant els diferents procediments analítics⁷.

2.2.6 Estabilitat

És necessari avaluar l'estabilitat de les dissolucions de les mostres durant el període de temps necessari per a elaborar-les i analitzar-les, ja que emprant equips automàtics com el que s'utilitza en aquest treball, aquest període de temps pot ser ampli. Per avaluar aquest paràmetre, es realitzen injeccions repetitives d'una mateixa mostra al llarg del temps⁹. En aquesta validació, donat que les mostres i els patrons es prepararan i analitzaran el mateix dia, s'estudiarà l'estabilitat de les mostres i els patrons al llarg d'un període de 24 hores, analitzant al moment de preparar les dissolucions, al cap de 8 hores, 12 hores i 24 hores.

2.2.7 Límit de detecció i de quantificació

El límit de detecció és la quantitat mínima d'analit present en la mostra que es pot detectar però no quantificar, mentre que el límit de quantificació és la quantitat mínima d'analit d'una mostra que es pot quantificar amb precisió i exactitud⁸. Tal i com s'exposa a la *Taula 1*, en aquest treball no s'estudiaran els límits de detecció i quantificació degut a que es validarà un mètode per a la determinació d'un principi actiu però no per les seves impureses i, per tant, es treballarà en rangs de concentració molt allunyats de les quantitats mínimes detectables i quantificables per l'equip⁶.

3 PART EXPERIMENTAL

El producte farmacèutic que s'estudia en aquest treball s'empra en el tractament de simptomatologies per diferents espècies d'animals de granja. Conté un únic principi actiu amb una concentració de 10 mg per cada 1 g de producte i diversos excipients en concentracions diferents. El principi actiu (del qual no es mencionarà el nom per motius de confidencialitat) és un sòlid blanc cristal·lí, polar, lleugerament soluble en aigua, etanol i metanol.

Per realitzar aquesta validació s'emprarà un detector DAD (Diode Array Detector), que permet mesurar a diferents longituds d'ona de forma simultània per obtenir la resposta màxima de cadascun dels analits de la mostra. A més, la cromatografia serà de fase inversa, on la fase estacionària és apolar i la fase mòbil polar, i consistirà en una mescla de tampó aquós i un solvent polar miscible en aigua².

3.1 Mètode analític

3.1.1 Material i reactius

El següent llistat correspon als materials i reactius necessaris per portar a terme la validació:

- Metanol (CH₃OH) per UV, IR, HPLC, ACS, ≥ 99,9%
- Acetonitril (CH₃CN) per UV, IR, HPLC, ACS, ≥ 99,9%
- Trietilamina (C₆H₁₅N) p.a., ≥ 99,5%
- Àcid fosfòric (H₃PO₄), 85%
- Matriu de l'especialitat farmacèutica (tots els components de l'especialitat farmacèutica a excepció del principi actiu)
- Matèria prima del principi actiu (100.0% de puresa)
- Patró del principi actiu
- Excipient A
- Excipient B
- Excipient C

3.1.2 Equips i instruments

El següent llistat correspon als equips i instruments necessaris per portar a terme la validació:

- pH-metre
- Bany d'ultrasons
- Balança analítica amb precisió 0.01 mg
- Bomba de filtració, set de filtració de fase mòbil i filtres de polipropilè.
- Vials per UHPLC, xeringues de 5 ml i filtres de nylon per xeringues.
- Columna de fase inversa BDS Hypersil 100 x 4'0 mm 3 µm.
- Cromatògraf de líquids Agilent Technologies System UHPLC i detector DAD amb injector automàtic.

3.1.3 Condicions cromatogràfiques

A la *Taula 2* s'exposen les condicions cromatogràfiques que s'utilitzaran per optimitzar i validar el mètode analític.

Taula 2. Condicions cromatogràfiques.

Columna	BDS Hypersil 100 x 4'0 mm 3 µm
Fase mòbil	20% Solució tampó / 80% ACN (canals separats)
Elució	Isocràtica
Diluent de les mostres	Metanol pel patró, i Aigua:Metanol (50:50) per les mostres
Flux	1'0 ml/min
Longitud d'ona de detecció	254 nm, 4 nm (Ref: 550 nm, 100 nm)
Volum d'injecció	Patró 0'4, 0'8 i 1'2 µL, i mostres 8 µL
Temperatura de la columna	25 °C
Termòstat	10 °C
Temps cromatograma	14 min

3.1.4 Càlculs previs

- Com s'ha comentat anteriorment, l'especialitat farmacèutica conté 10 mg de principi actiu per cada gram de producte. Per tal de poder elaborar aquesta especialitat al laboratori, es necessiten totes les matèries primes que conté el producte. La matèria prima per al principi actiu correspon al compost més una molècula de HCl, en canvi, els 10 mg de principi actiu mencionats abans corresponen al principi actiu en format base (sense la molècula de HCl). Per tan, aplicant un simple factor de conversió

Optimització i validació d'un mètode d'anàlisi per a una especialitat farmacèutica

s'obté la concentració del compost amb una molècula de HCl que equival a la concentració de l'especialitat farmacèutica: 10'97 mg/g.

A l'apartat 3.4 es mencionen les mostres MA80, MA90, MA100, MA110 i MA120. La concentració de principi actiu de la mostra MA100 correspon al 100% de concentració de principi actiu de l'especialitat farmacèutica (10'97 mg/g) i les mostres MA80, MA90, MA110 i MA120 tenen una concentració de principi actiu al 80%, 90%, 110% i 120%, respectivament, en relació amb la mostra MA100. A la *Taula 3* es troba el pes de principi actiu a pesar per elaborar cada mostra.

Taula 3. Pes en mil·ligrams de principi actiu HCl a pesar per a cada mostra.

Mostra	M80	M90	M100	M110	M120
Pes (mg)	8.77	9.87	10.97	12.07	13.16

- Encara que els volums d'injecció de les mostres i el patró estan predeterminats pel mètode analític, és necessari confirmar que la recta de calibratge que s'elaborarà a partir de les tres injeccions del patró, contindrà les quantitats d'analit injectat de totes les mostres. Les quantitats de principi actiu i de patró injectats a l'equip s'han obtingut mitjançant els càlculs següents:

$$\frac{\text{pes de principi actiu o patró (mg)}}{100 \text{ ml de dissolució}}$$
$$\cdot \frac{\text{Pes Molecular de principi actiu}}{\text{Pes Molecular de principi actiu amb molècula HCl}} \cdot \frac{1 \text{ ml}}{10^3 \mu\text{l}} \cdot \frac{10^3 \mu\text{g}}{1 \text{ mg}}$$
$$\cdot \text{volum d'injecció } (\mu\text{l}) = \text{quantitat de principi actiu injectat } (\mu\text{g})$$

El pes en mg de principi actiu de cada mostra es troba a la *Taula 3* i el pes de patró és 100 mg. Els resultats obtinguts aplicant els càlculs anteriors es mostren a la *Taula 4* i es pot observar com les quantitats de principi actiu injectats amb les mostres es troben entre el màxim i el mínim en la recta de calibratge.

Taula 4. Quantitats de principi actiu HCl i patró injectats a l'equip.

Mostra	Volum d'injecció (μl)	Principi actiu o patró injectat (μg)
Patró	0'4	0,40
Patró	0'8	0,80
Patró	1'2	1,20
MA80	8'0	0,70
MA90	8'0	0'79
MA100	8'0	0'88
MA110	8'0	0,97
MA120	8'0	1,05

3.1.5 Procediment analític

A continuació, es descriu el procediment analític necessari per elaborar la solució tampó, el diluent de les mostres, la solució patró, el blanc i els diferents tipus de mostres mencionats als apartats 3.2 i 3.3

- **Solució tampó:** Es dissolen 0.5 ml d'àcid fosfòric en 950 ml d'aigua ultrapura i s'ajusta a pH 7 amb trimetilamina. A continuació es porta a enràs amb aigua ultrapura en un matràs de 1 L i es filtra amb filtre de polipropilè.
- **Diluent de les mostres:** En una proveta, es mesura el 50% en volum de metanol i el 50% en volum d'aigua ultrapura, s'aboca en un vas de precipitats i es mescla amb un agitador magnètic.
- **Matriu:** El producte farmacèutic té una concentració de 1 mg/g de principi actiu, és a dir, un 1% en pes. El 99% restant del producte està format de tres excipients, l'excipient A es troba en un 1% en pes, l'excipient B es troba en un 10% en pes i l'excipient C es troba en un 88% en pes. Donat que es vol preparar la matriu sense principi actiu, es posarà un 89% de l'excipient C en lloc d'un 88%. Els passos a seguir per fer 100g de matriu són:
 - Introduir la meitat de la quantitat total de l'excipient C (44'5 g) en un envàs de plàstic de 100 ml.
 - Introduir l'excipient A (1 g).
 - Introduir l'excipient B (10 g).
 - Introduir la quantitat restant d'excipient A (44,5 g).
 - Mescla amb vareta de vidre durant 10 minuts com a mínim.

S'obté un sòlid blanc en pols.

- **Mostra:** Es pesen els mg de principi actiu necessaris per cada tipus de mostra (descrits a la *Taula 3*) i 1 g de matriu a la balança analítica. Es transfereixen a un matràs de 100 ml, es porta a enràs amb el diluent de les mostres i es porta al ultrasons durant dos minuts. Finalment, es filtra la solució amb un filtre de nylon 0.22 µm i s'introdueix el filtrat a un vial de cromatografia.
- **Patró:** Es pesen 100 mg de patró a la balança analítica i es transfereixen a un matràs de 100 ml. Es porta a enràs amb el diluent de les mostres i es porta al ultrasons durant dos minuts. Finalment, es filtra la solució amb un filtre de nylon 0.22 µm i s'introdueix el filtrat en un vial de cromatografia.

Optimització i validació d'un mètode d'anàlisi per a una especialitat farmacèutica

- Mostra de l'especialitat farmacèutica: Es pesa 1 g de producte a la balança analítica, es transfereixen a un matràs de 100 ml, es porta a enràs amb el diluent de les mostres i es porta al ultrasons durant dos minuts. Finalment, es filtra la solució amb un filtre de nylon 0.22 µm i s'introdueix el filtrat en un vial de cromatografia.
- Blanc: El diluent de les mostres es filtra amb un filtre de nylon 0.22 µm i s'introdueix el filtrat en un vial de cromatografia.

És recomanable condicionar l'equip cromatogràfic amb la fase mòbil de forma simultània a la preparació de les mostres, blancs i patrons per tal d'optimitzar el temps.

3.2 Optimització del mètode analític

Es va realitzar una optimització del mètode analític simplement com una oportunitat per fer un anàlisi previ a la validació del mètode per a que l'analista (la redactora d'aquest treball) es familiaritzés amb el mètode, el procés experimental i els càlculs necessaris a realitzar.

A més, aquesta anàlisi previ permet estudiar les recuperacions i els coeficients de variació que s'obtenen aplicant les condicions d'anàlisi del mètode i permet detectar possibles errors, defectes o imprevistos del procés experimental abans de fer la validació.

Es va decidir fer una anàlisi de tres repeticions de les mostres MA80, MA100 i MA120 per avaluar les recuperacions a les concentracions més baixes i altes amb les que es treballarà i a la concentració del producte farmacèutic. Juntament amb aquestes mostres es va analitzar un blanc i un patró per poder realitzar la recta de calibratge i la posterior quantificació.

Tal i com s'explica a l'apartat 4.2, els resultats del primer anàlisi mostren recuperacions fora dels criteris per la mostra MA80, pel que es va decidir repetir l'anàlisi de les mostres MA80 i MA100. Juntament amb aquestes mostres es va analitzar un blanc i un patró per poder realitzar la recta de calibratge i la posterior quantificació.

3.3 Validació del mètode analític

Per a portar a terme la validació d'un mètode analític és necessari elaborar diferents tipus i número de mostres en funció de la informació analítica que requereixin els tests estadístics necessaris per avaluar cada paràmetre.

3.3.1 Selectivitat

La selectivitat no es pot avaluar exclusivament determinant el temps de retenció, és necessari confirmar l'absència d'interferències aplicant una tècnica complementaria, que en aquest cas, és la cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC) acoblada a un detector de díodes (DAD).

En general, la selectivitat s'avalua comparant els resultats d'anàlisi de mostres amb i sense presència d'analit i en presència i/o absència d'impureses, substàncies relacionades o excipients. Per fer-ho, s'ha de preparar patró (l'analit), una mostra amb la matriu i una mostra amb l'analit i la matriu. Per tant, per avaluar la selectivitat del mètode d'anàlisi d'una especialitat farmacèutica, es va preparar i analitzar un triplicat de la mostra MA100 (analit i matriu), un triplicat de la mostra matriu (sense principi actiu) i, per últim, un blanc i un patró (analit).

Per avaluar la selectivitat s'ha estudiat la resposta obtinguda per la matriu, que no ha de presentar resposta al mateix temps de retenció en el que apareix l'analit. A més, s'ha estudiat la resposta obtinguda a l'analitzar els patrons i les mostres, ja que aquestes han de ser similars entre si i els pics han de ser cromatogràficament purs⁶.

3.3.2 Linealitat i rang

Per fer validacions del mètode d'anàlisi de producte acabat (com una especialitat farmacèutica) es recomana validar un rang de concentracions d'entre el 80% i el 120% del contingut teòric de principi actiu del producte⁷. Dins d'aquest rang, es recomana estudiar cinc nivells de concentracions i fer un triplicat de cada nivell⁶. Per això es va preparar i analitzar un blanc, un patró i un triplicat de les mostres MA80, MA90, MA100, MA110 i MA120.

Encara que estadísticament les mostres s'haurien d'analitzar de forma aleatòria, forma part dels criteris establerts analitzar les mostres en sentit creixent de concentració, és a dir, primer les mostres MA80 i per últim les mostres MA120, per tal de evitar possibles efectes de memòria en l'equip.

Optimització i validació d'un mètode d'anàlisi per a una especialitat farmacèutica

Amb els resultats obtinguts s'han realitzat els següents càlculs i tests estadístics:

- Recta de regressió calculant l'equació de la recta (pendent i ordenada a l'origen), el coeficient de correlació i el coeficient de determinació.
- Anàlisi de la variància (ANOVA) comprovant la normalitat dels residuals i realitzant un test de Cochran.
- Test de linealitat mitjançant els coeficients de variació dels factors de resposta i un test t de Student per avaluar la significació estadística de la desviació estàndard de la pendent⁶.

3.3.3 Precisió

3.3.3.1 Repetibilitat

Per tal d'avaluar la repetibilitat del sistema instrumental es van realitzar sis injeccions d'una única mostra MA100, a més de preparar i analitzar un patró i un blanc. Per avaluar la repetibilitat del mètode es van preparar i analitzar un patró, un blanc i sis repeticions de la mostra MA100.

Per tal d'avaluar la repetibilitat del sistema instrumental i del mètode s'han calculat els coeficients de variació dels senyals obtinguts a les dues anàlisis descrites al paràgraf anterior i s'han comparat amb el coeficient de variació dels criteris d'acceptació. A més, s'ha calculat l'interval de confiança dels resultats de l'anàlisi per la repetibilitat del mètode.

3.3.3.2 Precisió intermèdia

Per estudiar la precisió intermèdia és important considerar els factors a estudiar. En el laboratori en el que s'ha realitzat aquest treball, donades les seves característiques, els factors d'instrument i d'analista es van descartar ja que en condicions normals un únic analista utilitza un únic instrument per realitzar els anàlisis. Per aquest motiu, es considera que la principal font de variació del mètode és el dia de l'anàlisi.

Per tant, per tal d'avaluar la precisió intermèdia s'han d'analitzar tres repeticions de la mostra MA100 en tres dies diferents, és a dir, nou repeticions en total⁶. Donat que, per l'avaluació de la linealitat, la selectivitat i la repetibilitat ja es van analitzar tres repeticions de la mostra MA100, amb l'objectiu d'optimitzar temps i recursos s'han emprat els resultats d'aquestes anàlisis en lloc de realitzar-ne una per avaluar la precisió intermèdia.

Amb els resultats obtinguts s'ha calculat el coeficient de variació dels senyals i s'ha comparat amb el coeficient de variació dels criteris d'acceptació (veure *Taula 8* a l'apartat 4.2).

3.3.4 Exactitud

És necessari avaluar l'exactitud en tot el rang de concentracions de treball d'aquesta validació del mètode (de 80% a 120%) i és recomanable fer tres repeticions de tres nivells de concentració diferents, preferiblement de la concentració central i dels extrems⁶. Per tant, per tal d'avaluar l'exactitud és necessari preparar i analitzar tres repeticions de les mostres MA80, MA100 i MA120, a més d'un blanc i el patró. Donat que aquestes mostres ja es van analitzar al avaluar la linealitat i el rang, s'han emprat els resultats d'aquest anàlisi en lloc de portar a terme un altre especialment per avaluar l'exactitud.

Amb els resultats obtinguts s'ha calculat el percentatge de recuperació de les mostres i s'ha realitzat un test de Cochran per confirmar la homogeneïtat de les variàncies⁶.

3.3.5 Robustesa

Per evitar que un paràmetre del mètode sofreixi una variació que provoqui discrepàncies entre els resultats de diferents anàlisis, s'han d'avaluar les principals fonts de variació del mètode per identificar els factors potencialment crítics.

El primer pas és establir els paràmetres a estudiar. En aquest cas, s'estudiaran paràmetres quantitatius, per exemple, influència dels valors de pH o temperatura, i no s'estudiaran factors qualitius com el fabricant de la columna o els reactius. A continuació, s'han d'establir els intervals de variació en el que s'avaluaran aquests paràmetres, que en moltes ocasions estableix el propi analista basant-se en l'experiència. En general els marges de fluctuació de cada factor es distribueixen simètricament respecte al valor nominal especificat al mètode d'anàlisi.

Una forma senzilla d'avaluar la robustesa és realitzar anàlisis canviant un sol paràmetre cada cop i comparant els resultats entre ells. Però, en cas d'haver d'estudiar molts paràmetres s'hauria d'invertir molt de temps i recursos i, a més, no s'estaria tenint en compte la interacció entre diferents factors. Per tant, la forma més eficaç d'avaluar la robustesa és realitzant un disseny factorial, concretament per aquest treball, el disseny factorial fraccionat de Plackett-Burman.

El disseny de Plackett-Burman és el més habitual i senzill perquè permet avaluar l'efecte de f factors realitzant $(f+1)$ experiments. No suposa un problema que no permeti l'avaluació de l'efecte de les interaccions entre factors ja que, a la pràctica, aquest efecte tendeix a ser menyspreable⁶.

Optimització i validació d'un mètode d'anàlisi per a una especialitat farmacèutica

A la *Taula 5* es poden veure els factors crítics del mètode que s'avaluen en aquest treball, junt amb el valor nominal i els valors alternatius de cada factor. A més, a la *Taula 6* es troba el disseny factorial fraccionat de Plackett-Burman amb els factors crítics i els valors alternatius ja introduïts (en blau els valors màxims i en groc els valors mínims). Donat que s'avaluen set factors, hi ha un total de vuit experiments a realitzar.

Taula 5. Factors crítics, valors nominals i valors alternatius.

	Factors crítics	Valor nominal	Valors alternatius (-/+)
A	Estabilitat de la solució tampó	0 dies	3 dies – 7 dies
B	Temperatura de la columna	25 °C	22 °C – 28 °C
C	Flux	1'0 ml/min	0'9 ml/min – 1'1 ml/min
D	Longitud d'ona (UV)	248'4 nm	246'4 nm – 250'4 nm
E	Volum d'injecció	8 µl	7 µl – 9 µl
F	pH de la solució tampó	7'0	6'8 – 7'2
G	% d'acetonitril en fase mòbil	80%	77% - 83%

Taula 6. Disseny factorial fraccionat de Plackett-Burman

Exp.	Factor						
	A	B	C	D	E	F	G
1	7 dies	22 °C	0.9 ml/min	250'4nm	7 µl	7'2	83%
2	7 dies	28 °C	0.9 ml/min	246'4nm	9 µl	6'8	83%
3	7 dies	28 °C	1.1 ml/min	246'4nm	7 µl	7'2	77%
4	3 dies	28 °C	1.1 ml/min	250'4nm	7 µl	6'8	83%
5	7 dies	22 °C	1.1 ml/min	250'4nm	9 µl	6'8	77%
6	3 dies	28 °C	0.9 ml/min	250'4nm	9 µl	7'2	77%
7	3 dies	22 °C	1.1 ml/min	246'4nm	9 µl	7'2	83%
8	3 dies	22 °C	0.9 ml/min	246'4nm	7 µl	6'8	77%

Per tant, per tal d'avaluar la robustesa, es van preparar 2L de solució tampó a pH 7'2 i 2L de solució tampó a pH 6'8. Tres dies després es va utilitzar 1L de cada solució tampó per fer els experiments 4, 6, 7 i 8. Set dies després de preparar les solucions tampó es van fer els experiments 1, 2, 3 i 5. A la *Taula 6* s'indica en quines condicions es va portar a terme cada anàlisi.

Per poder quantificar l'analit en cada experiment, junt amb les mostres es va analitzar un patró tant el dia tres com el dia set utilitzant les dues classes de tampó. Donat que

Optimització i validació d'un mètode d'anàlisi per a una especialitat farmacèutica

es van utilitzar dues fases mòbils diferents cada dia (amb diferents pH), els patrons també es van analitzar dues vegades, un amb cada fase mòbil emprada.

Per avaluar la robustesa s'ha calculat el percentatge d'influència de cada factor i s'han comparat les influències de cada factor entre sí.

3.3.6 Estabilitat

Per tal d'avaluar l'estabilitat es va preparar un blanc, un patró i una mostra MA100 i es van analitzar la mostra i el patró immediatament després de preparar-los, vuit hores després, dotze hores després i vint-i-quatre hores després. Això ha estat possible gràcies a l'injector automàtic de l'equip i als temps "post-run" programats a la seqüència d'anàlisi.

Per avaluar l'estabilitat s'ha calculat el coeficient de variació de les senyals tant del patró com de la mostra al llarg de les vint-i-quatre hores i s'han comparat amb el coeficient de variació dels criteris d'acceptació.

3.4 Anàlisi de mostres de l'especialitat farmacèutica

Per confirmar que el mètode d'anàlisi és adequat per analitzar el producte farmacèutic, es va analitzar el producte mitjançant el mètode a validar. Es va escollir un lot de producte farmacèutic recent sortit de fàbrica (menys d'un mes) i un lot recent caducat (36 mesos).

Es van preparar tres mostres de cada lot de producte pesant 1g de producte que es van transferir a un matràs de 100 ml, es van portar a enràs amb el diluent de les mostres i es van portar al ultrasons durant dos minuts. Finalment, es van filtrar les mostres amb un filtre de nylon 0.22 µm i es va introduir el filtrat a un vial de cromatografia.

Amb els resultats d'aquesta anàlisi s'ha calculat el percentatge de recuperació de cada mostra i el coeficient de variació del grup de mostres. A més, s'ha realitzat un test de Cochran per confirmar la homogeneïtat de les variàncies i un test t per confirmar que les recuperacions siguin estadísticament acceptables.

4 RESULTATS I DISCUSSIÓ

4.1 Càlculs generals

Un cop realitzat una anàlisi, l'equip cromatogràfic ens aporta una sèrie de dades, com ara els temps de retenció, l'alçada i l'àrea dels pics cromatogràfics, entre d'altres. És necessari transformar aquestes dades en la informació necessària per a portar a terme els càlculs i tests estadístics necessaris per validar el mètode.

Per l'obtenció de la concentració de cada repetició de mostra analitzada i del coeficient de variació de cada grup de mostres s'han realitzat els següents càlculs generals:

- Es calcula la quantitat de patró injectada al cromatògraf mitjançant els càlculs següents:

$$\frac{\text{pes de patró (mg)}}{100\text{ml de dissolució}} \cdot \frac{\text{Pes Molecular de principi actiu (mg)}}{\text{Pes Molecular de principi actiu amb molècula HCl (mg)}} \cdot \frac{1\text{ml}}{10^3\mu\text{l}} \cdot \frac{10^3\mu\text{g}}{1\text{mg}} \cdot \text{volum d'injecció (\mu\text{l})} = \text{patró injectat (\mu\text{g})}$$

Aplicant els càlculs anteriors s'obté la informació que es mostra a la *Taula 7*. Aquesta taula és un model a partir del qual es construïran totes les rectes de calibratge als apartats 4.3 i 4.4.

Taula 7. Dades de l'eix x i l'eix y per construir la recta de calibratge.

Volum injectat de patró (μl)	Quantitat pesada de patró (mg)	Quantitat injectada de patró (μg)	Àrea del pic (mAU)
0'4	Quantitat pesada de patró 1	Quantitat injectada de patró 1	Àrea del pic 1
0'8	Quantitat pesada de patró 2	Quantitat injectada de patró 2	Àrea del pic 2
1'2	Quantitat pesada de patró 3	Quantitat injectada de patró 3	Àrea del pic 3

- S'elabora de la recta de calibratge representant la quantitat de patró injectat a l'eix d'abscisses o eix x i l'àrea del pic cromatogràfic corresponent a l'eix d'ordenades o eix y (*Taula 7*). La recta de calibratge està definida per l'*Equació 1*¹⁰, on x és la variable depenent (quantitat de patró injectada), y és la variable dependent (àrea del pic cromatogràfic), b₀ és l'ordenada a l'origen i b₁ és la pendent. Els coeficients de la recta de calibratge (ordenada a l'origen i pendent) es calculen amb el mètode de mínims quadrats mitjançant l'*Equació 2*¹⁰ i l'*Equació 3*¹⁰.

$$y = b_0 + b_1 \cdot x$$

Equació 1

$$b_1 = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x}) \cdot (y_i - \bar{y})}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})} \quad \text{Equació 2}$$

$$b_0 = \bar{y} - b_1 \cdot \bar{x} \quad \text{Equació 3}$$

La pendent és directament proporcional amb la sensibilitat i l'ordenada a l'origen és la intersecció de la recta amb l'eix y⁶.

- A continuació, s'introdueixen en l'Equació 1 els valors de les àrees dels pics cromatogràfics obtinguts en l'anàlisi de les mostres (variable dependent) per obtenir la quantitat de principi actiu injectat (variable independent).
- Seguidament, es calculen les concentracions o el percentatge de recuperació de les mostres, dependent del que sigui necessari en cada cas.

Càlcul de la concentració en percentatge d'una mostra:

$$\frac{\text{principi actiu injectat } (\mu\text{g})}{\text{volum d'injecció } (8 \mu\text{l})} \cdot \frac{\text{volum de dissolució } (100 \text{ ml})}{\text{principi actiu dissolt } (\text{mg})}$$

$$\cdot \frac{\text{Pes Molecular de principi actiu amb molècula HCl } (\text{mg})}{\text{Pes Molecular de principi actiu } (\text{mg})} \cdot \frac{10^3 \mu\text{l}}{1 \text{ ml}} \cdot \frac{1 \text{ mg}}{10^3 \mu\text{g}}$$

$$\cdot \frac{\% \text{ de concentració respecte el valor nominal}}{100 \%} \cdot 100 = \text{concentració } (\%)$$

Per calcular la recuperació en percentatge, “% de concentració respecte el valor nominal” ha de ser 100%.

- Per últim, es calcula el coeficient de variació de les concentracions del grup de mostres a avaluar emprant l'Equació 4⁶.

$$CV(\%) = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100 \quad \text{Equació 4}$$

La desviació estàndard (s) es calcula mitjançant l'Equació 5⁴, on N és el número de repeticions al grup de mostres.

$$s = \frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})}{N} \quad \text{Equació 5}$$

4.2 Criteris d'acceptació

Per poder avaluar els resultats obtinguts als diferents càlculs i tests estadístics dels apartats 3.4 i 4.4 és necessari comparar els resultats experimentals amb els criteris d'acceptació definits per a cadascun dels paràmetres estudiats. Aquesta sèrie de criteris es troben a la *Taula 8*⁶.

*Taula 8. Criteris d'acceptació*⁶.

Paràmetre avaluat	Criteri d'acceptació
Selectivitat	Diferenciació de totes les espècies químiques presents a la mostra.
Linealitat i rang	
Coeficient de correlació (r)	$\geq 0'99$
Homogeneïtat de les variàncies	$G_{\text{experimental}} \leq G_{\text{tabulada}} (0'68)$
Factor resposta	$CV(\%) \leq 2'0\%$
Desviació de la pendent	$t_{\text{experimental}} \geq t_{\text{tabulada}} (2'16)$
Precisió	
Repetibilitat instrumental	$CV(\%) \leq 2'0\%$
Repetibilitat del mètode	$CV(\%) \leq 2'8\%$
Precisió intermèdia	$CV(\%) \leq 5'6\%$
Exactitud	
Recuperació	97'0% - 103'0%
Test de Cochran	$G_{\text{experimental}} \leq G_{\text{tabulada}} (0'87)$
Test t	$t_{\text{experimental}} \leq t_{\text{tabulada}} (2'31)$
Estabilitat	$CV(\%) \leq 5'0\%$
Robustesa del paràmetre estudiat	% d'efecte $\leq 2\%$ en valor absolut

4.3 Optimització del mètode analític

Aplicant els càlculs definits l'apartat 4.1 es van obtenir les dades amb les que es va construir la recta de calibratge. L'ordenada a l'origen és 248392, i la pendent és 9249990. Mitjançant aquesta recta de calibratge i els càlculs definits l'apartat 4.1 es van obtenir els resultats que es mostren a la *Taula 9*.

Optimització i validació d'un mètode d'anàlisi per a una especialitat farmacèutica

Taula 9. Resultats del primer anàlisi de la optimització del mètode analític.

Mostra	Quantitat pesada mostra (mg)	Quantitat injectada de mostra (μg)	Àrea del pic (mAU)	Recuperació (%)	Mitjana (%)	CV (%)
MA80 (1)	8'31	0'59	5675571	96'8		
MA80 (2)	8'29	0'60	5814968	99'5	97'6	1'75
MA80 (3)	8'30	0'58	5645310	96'4		
MA100 (1)	10'27	0'74	7071546	98'5		
MA100 (2)	10'37	0'74	7082700	97'7	98'5	0'87
MA100 (3)	10'36	0'75	7195522	99'4		
MA120 (1)	11'99	0'86	8246909	98'9		
MA120 (2)	12'08	0'87	8264755	98'4	98'8	0'35
MA120 (3)	12'36	0'89	8505454	99'0		

Donat que es van obtenir recuperacions de dues repeticions de la mostra MA80 (marcats en vermell) fora dels criteris d'acceptació (97'0% - 103'0%), es va fer un segon anàlisi tal i com s'explica a l'apartat 3.3 per confirmar un possible problema de recuperacions baixes a baixes concentracions o un possible error en la preparativa de les mostres.

Aplicant els càlculs definits l'apartat 4.1 es van obtenir les dades amb les que es va construir recta de calibratge. L'ordenada a l'origen és 248392, i la pendent és 9249990. Mitjançant aquesta recta de calibratge i els càlculs definits l'apartat 4.1 es van obtenir els resultats que es mostren a la Taula 10.

Taula 10. Resultats del primer anàlisi de la optimització del mètode analític.

Mostra	Quantitat pesada mostra (mg)	Quantitat injectada de mostra (μg)	Àrea del pic (mAU)	Recuperació (%)	Mitjana (%)	CV (%)
MA80 (1)	8'12	0'58	5571	98'2		
MA80 (2)	8'11	0'59	5627	99'4	99,3	1'00
MA80 (3)	8'18	0'60	5721	100'2		
MA100 (1)	10'17	0'74	7040	99'6		
MA100 (2)	10'4	0'76	7235	100'2	100'1	0'42
MA100 (3)	10'43	0'76	7276	100'4		

En aquest segon anàlisi es van obtenir recuperacions dintre dels criteris per a totes les mostres així com coeficients de variació inferiors, el que porta a pensar que al primer anàlisi es va cometre un error en la preparativa.

4.4 Validació del mètode analític

4.4.1 Selectivitat

A la *Figura 1* es mostra el cromatograma del patró de principi actiu on es pot observar que el pic cromatogràfic del principi actiu es troba al voltant dels set minuts.

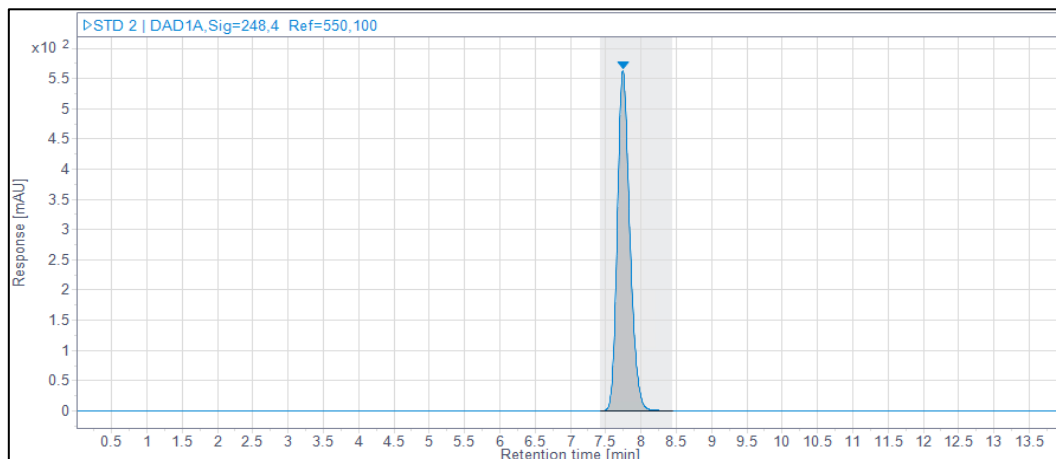


Figura 1. Pic cromatogràfic del principi actiu.

La relació senyal/soroll mínima per quantificar (corresponent al límit de quantificació) és de 10, és a dir, el senyal de l'analit és 10 vegades major que el senyal del soroll⁶. Donat que la relació senyal/soroll a la *Figura 1* és de 2060 (valor proporcionat pel programa OpenLab), el pic de principi actiu presenta una relació senyal/soroll adequada.

A la *Figura 2* es mostra la resposta del patró (línia blava), la resposta de la mostra MA100 (línia verda) i la resposta de la matriu (línia violeta). Com es pot observar, al cromatograma corresponent a la matriu no s'observa cap pic cromatogràfic que pugi interferir amb el pic del principi actiu. A més, els pics de la mostra i el patró són similars entre sí, el que indica la presència del principi actiu a la mostra.

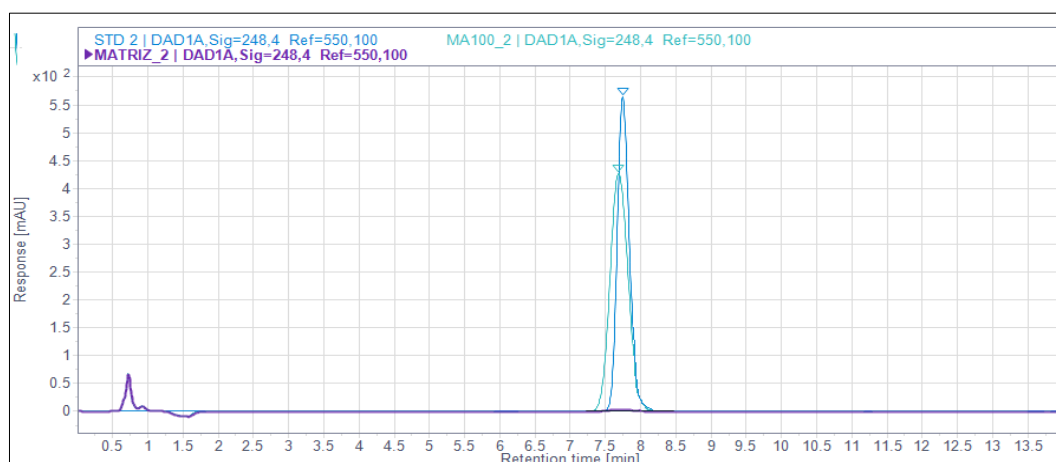


Figura 2. Cromatogrames del patró, mostra MA100 i mostra matriu.

Optimització i validació d'un mètode d'anàlisi per a una especialitat farmacèutica

La *Figura 3* correspon a les tres repeticions de les mostres matriu. S'observa un pic cromatogràfic generat per la pròpia matriu però que no influeix en la quantificació del principi actiu.

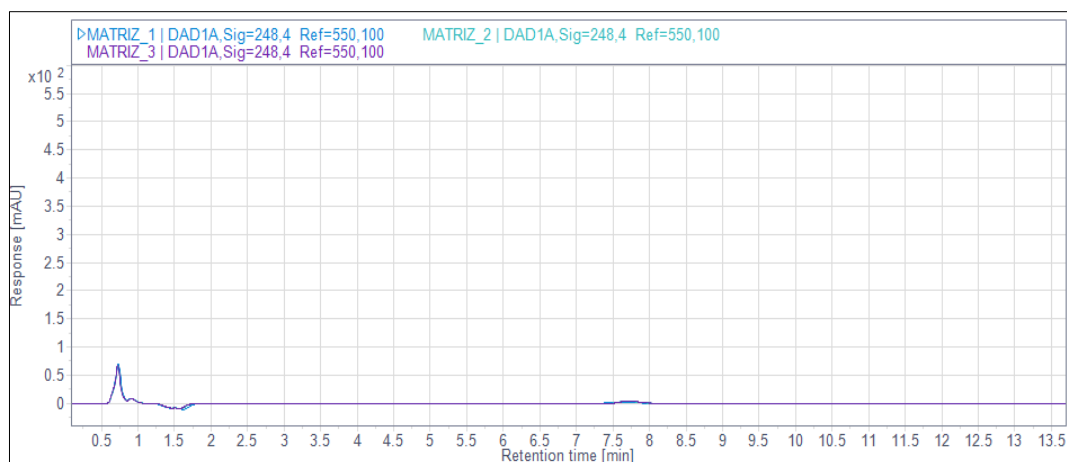


Figura 3. Cromatogrames de les mostres de matriu.

Per tant, es conclou que el mètode analític permet la identificació inequívoca de l'analít.

4.4.2 Linealitat i rang

Aplicant els càlculs definits a l'apartat 4.1 als resultats de l'anàlisi per l'avaluació del rang i la linealitat s'ha obtingut la informació de la *Taula 11*.

Taula 11. Dades de l'eix x i l'eix y per construir la recta de calibratge.

Volum injectat de patró (µl)	Quantitat pesada de patró (mg)	Quantitat injectada de patró (µg)	Àrea del pic
0'4	100'28	0'37	3565
0'8		0'73	6888
1'2		1'10	10311

A continuació s'ha construït una recta de calibratge. L'ordenada a l'origen és 174'6 (*Equació 2*) i la pendent és 9225 (*Equació 3*). Mitjançant aquesta recta de calibratge i els càlculs definits a l'apartat 4.1 s'han obtingut els resultats mostrats a la *Taula 12*.

Optimització i validació d'un mètode d'anàlisi per a una especialitat farmacèutica

Taula 12. Resultats de l'anàlisi de la linealitat i el rang del mètode analític.

Mostra	Quantitat pesada de mostra (mg)	Quantitat injectada de mostra (µg)	Àrea del pic (mAU)	Recup. (%)	Conc. (%)	Mitjana (%)	CV (%)
MA80 1	8'75	0'65	6171	101'9	81'5		
MA80 2	8'83	0'65	6192	101'3	81'0	101'4	0'35
MA80 3	8'84	0'65	6193	101'2	81'0		
MA90 1	9'94	0'72	6845	99'7	89'8		
MA90 2	9'81	0'73	6880	101'6	91'4	100'5	0'97
MA90 3	9'94	0'73	6871	100'1	90'1		
MA100 1	11'05	0'82	7707	101'3	101'3		
MA100 2	10'95	0'80	7578	100'5	100'5	100'8	0'48
MA100 3	10'9	0'80	7543	100'5	100'5		
MA110 1	12'06	0'89	8395	101'3	111'4		
MA110 2	12'05	0'89	8363	101'0	111'1	101'3	0'29
MA110 3	12'04	0'89	8403	101'6	111'7		
MA120 1	13'22	0'98	9203	101'5	121'8		
MA120 2	13'21	0'97	9129	100'8	120'9	101'0	0'44
MA120 3	13'13	0'96	9070	100'7	120'8		

Donat que els percentatges de recuperació de les mostres es troben entre el 97'0% i el 103'0% de recuperació establert, i els coeficients de variació són menors al 2%, els resultats es troben dintre dels criteris d'acceptació (veure Taula 8).

Recta de calibratge

A la Figura 4 es mostra la recta de calibratge construïda amb les mostres per avaluar la linealitat. S'han representat les àrees (eix y) en funció de les concentracions (eix x). L'ordenada a l'origen és 145'8 (Equació 2) i la pendent és 77'6 (Equació 3). La equació de la recta de calibratge és de tipus lineal.

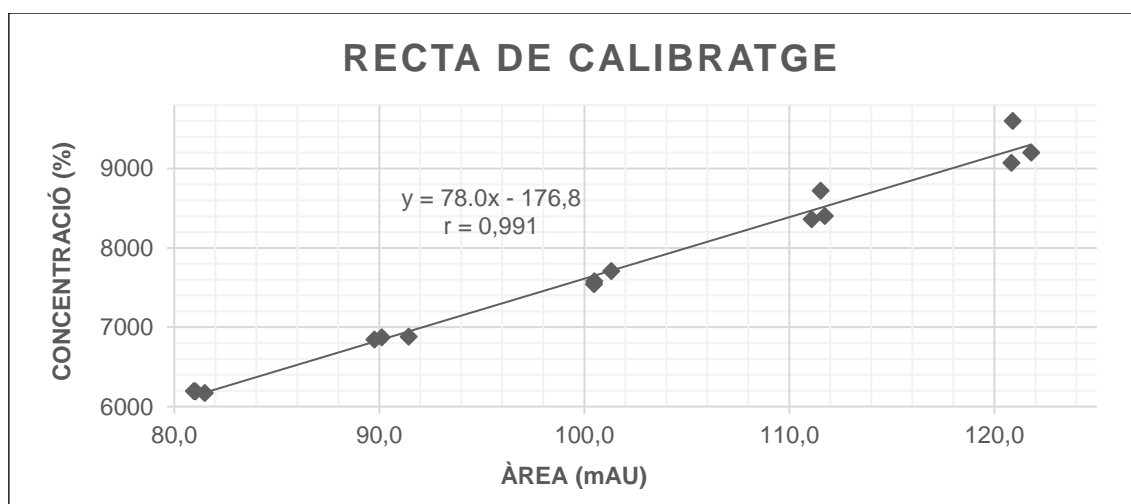


Figura 4. Recta de calibratge per linealitat i règim.

Coeficient de correlació

El coeficient de correlació (r) indica el grau de correlació, en aquest cas lineal, entre la variable x i la variable y . Com a màxim pot donar un valor de 1, cas en el que la probabilitat de correlació és màxima, en canvi, si s'apropa a 0, significa que no hi ha correlació lineal entre les variables⁶. Aplicant l'Equació 6⁶ s'ha obtingut el coeficient de correlació, que és 0'991, i per tant entra dintre dels criteris d'acceptació ($r \geq 0'99$). c

$$r = \frac{\sum(x-\bar{x})(y-\bar{y})}{\sqrt{\sum(x-\bar{x})^2 \sum(y-\bar{y})^2}} \quad \text{Equació 6}$$

Representació gràfica dels residuals

Per fer una gràfica dels residuals s'ha de representar els residuals (e_i) en funció de les àrees teòriques (\hat{y}), les quals s'han calculat introduint a la recta de calibratge els valors de concentració de la *Taula 12*. Els residuals s'han calculat mitjançant l'Equació 7⁶ i la gràfica que s'ha obtingut es troba a la *Figura 5*.

$$e_i = \hat{y}_i - y_i \quad \text{Equació 7}$$

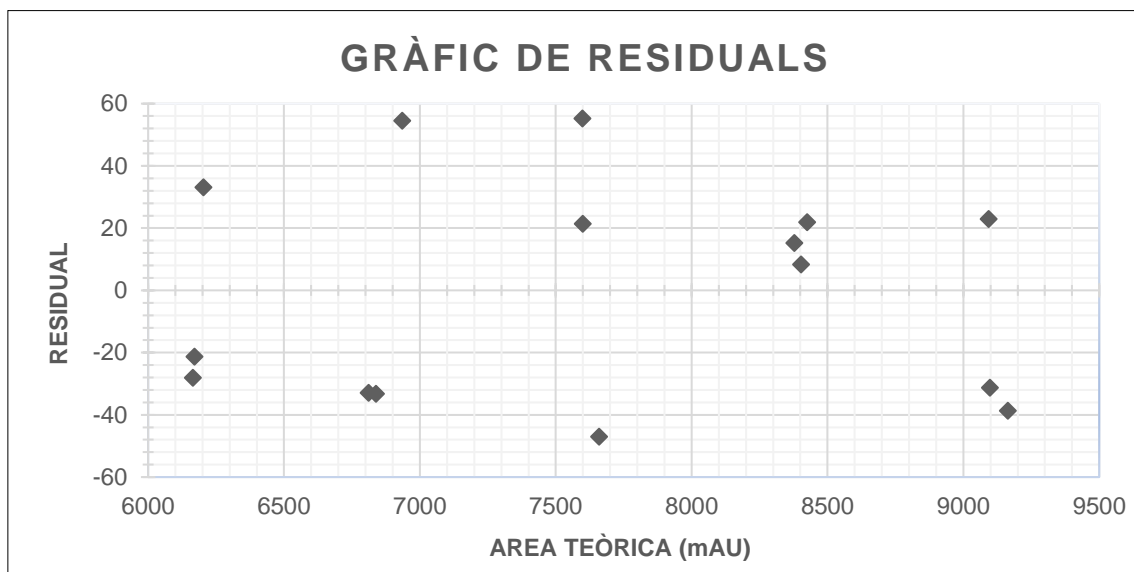


Figura 5. Gràfic de residuals.

La distribució dels punts de la *Figura 5* és aleatòria i no mostra cap tendència.

Anàlisi de la variància (ANOVA)

L'anàlisi de variància es compon de dos parts; un test de normalitat per comprovar la normalitat dels residuals i un test de Cochran per comprovar la homogeneïtat de les variàncies.

1) Test de normalitat

S'han calculat els estadístics F_1 i F_2 amb l'objectiu de comparar-los amb els valors tabulats de F i demostrar o no la existència d'una pendent diferents a 0 i la linealitat dels resultats. F_1 i F_2 s'han obtingut aplicant els càlculs descrits a la *Taula 13* on:

- k és el nombre de grups de concentracions.
- i és el conjunt de grups de concentracions.
- j és el conjunt de sèries⁶.

Taula 13. Fórmules ANOVA⁶.

	Suma de quadrats (SC)	Graus de llibertat (gl)	Variància (V)	F
Regressió	$SC_{REG} = \sum_i n_i \cdot (\hat{y}_{ij} - \bar{y}_i)^2$	1	$V_{REG} = \frac{SC_{REG}}{gl_{REG}}$	$F_1 = \frac{V_{REG}}{V_{RES}}$
Residuals	$SC_{RES} = SC_{FA} + SC_{EXP}$	$\sum_i n_i - 2$	$V_{RES} = \frac{SC_{RES}}{gl_{RES}}$	$F_2 = \frac{V_{FA}}{V_{EXP}}$
Falta d'ajust	$SC_{FA} = \sum_i n_i \cdot (\bar{y} - \hat{y}_i)^2$	$k - 2$	$V_{FA} = \frac{SC_{FA}}{gl_{FA}}$	
Error experimental	$SC_{EXP} = \sum_i \sum_j (y_{ij} - \bar{y}_i)^2$	$\sum_i n_i - k$	$V_{EXP} = \frac{SC_{EXP}}{gl_{EXP}}$	
Total	$SC_T = SC_{RES} + SC_{REG}$	$\sum_i n_i - 1$		

Els resultats obtinguts aplicant els càlculs de la *Taula 13* es troben a la *Taula 14*.

Taula 14. Resultats ANOVA.

	Suma de quadrats (SC)	Graus de llibertat (gl)	Variància (V)	F
Regressió	16956937	1	16956937	4742
Residuals	46491	13	3576	2'71
Falta d'ajust	20847	3	6949	-
Error experimental	25644	10	2564	-
Total	17003429	14	-	-

Donat que $F_{1,exp}$ és superior a $F_{1,tab}$ ($F_{1,tab} (\alpha=0'05, 1, 13) = 4'67$)¹¹, s'ha demostrat la existència d'una pendent significativament diferent a 0. Donat que $F_{2,exp}$ és inferior a $F_{2,tab}$ ($F_{2,tab} (\alpha=0'05, 3, 10) = 3'71$)¹¹, s'ha demostrat que hi ha linealitat entre els resultats obtinguts.

2) Test de Cochran

El test de Cochran és un test d'igualtat de variàncies de varis grups de mostres de mateix mida i permet determinar si el factor concentració influeix o no en els resultats. S'ha aplicat l'Equació 8⁶, on el terme s_i^2 és la variància de cada grup de concentracions i el terme $s_{màxima}^2$ és la variància màxima dels grups⁶.

$$G_{exp} = \frac{s_{màxima}^2}{\sum s_i^2} \quad \text{Equació 8}$$

S'ha obtingut una G_{exp} de 0'40. La G_{exp} és inferior a G_{tab} ($G_{tab} (\alpha=0'05, k=3, n=3) = 0'68$)¹¹, el que indica que les variàncies són homogènies i que no existeix heterocedasticitat.

Test de linealitat

S'ha estudiat dos paràmetres diferents per verificar la linealitat.

1) Coeficients de variació dels factors de resposta (f)

El factor resposta f indica, de forma aproximada, la sensibilitat de calibratge i s'ha obtingut dividint la resposta (àrea) entre la concentració. Donat que aquest és un calibratge lineal s'espera que els factors resposta siguin similars entre sí i semblants a la pendent. Per valorar el factor resposta se'n calcula el coeficient de variació aplicant l'Equació 9⁶, on s_f és la desviació estàndard dels factors resposta i \bar{f} es el valor mig dels factors resposta⁶.

$$CV(\%) = \frac{s_f}{\bar{f}} \quad \text{Equació 9}$$

El coeficient de variació és 0'67% i entra dintre dels criteris d'acceptació ($CV(\%) \leq 2'0\%$). Per tant, es pot afirmar que els factors resposta són similars entre sí.

2) Desviació estàndard de la pendent

S'ha realitzat un test t de Student per confirmar que la pendent és significativament diferent de zero. L'estadístic t_{exp} s'ha calculat emprant l'Equació 10⁶, on $s_{x,y}^2$ és la variància residual⁶.

$$t_{exp} = \frac{b_1}{s_{x,y}^2} \quad \text{Equació 10}$$

S'ha obtingut una t_{exp} de 112. Donat que t_{exp} és superior a t_{tab} ($t_{tab} (\alpha=0'05, g_{T-1}=13) = 2'16$)¹¹ Es confirma que la pendent és significativament diferent de zero.

4.4.3 Precisió

4.4.3.1 Repetibilitat

Aplicant els càlculs definits a l'apartat 4.1 als resultats de l'anàlisi per la repetibilitat s'ha obtingut la informació de la *Taula 15*.

Taula 15. Dades de l'eix x i l'eix y per construir la recta de calibratge.

Volum injectat de patró (µl)	Quantitat pesada de patró (mg)	Quantitat injectada de patró (µg)	Àrea del pic
0'4	100'37	0'37	3702
0'8		0'73	7338
1'2		1'10	10811

A continuació s'ha construït una recta de calibratge. L'ordenada a l'origen és 174'8 (*Equació 2*) i la pendent és 9712 (*Equació 3*). Mitjançant aquesta recta de calibratge i els càlculs definits a l'apartat 4.1 s'han obtingut els resultats de la *Taula 16* i *Taula 17*.

Repetibilitat del mètode

Taula 16. Resultats de l'anàlisi de la repetibilitat del mètode.

Mostra	Quantitat pesada de mostra (mg)	Quantitat injectada de mostra (µg)	Àrea del pic (mAU)	Recup. (%)	Mitjana (%)	CV (%)
MA100 (1)	11'08	0'80	7912	98'6	100'3	1'63
MA100 (2)	10'95	0'81	8018	101'1		
MA100 (3)	11'07	0'80	7939	99'0		
MA100 (4)	11'11	0'82	8147	101'3		
MA100 (5)	11'12	0'80	7981	99'1		
MA100 (6)	10'93	0'82	8124	102'7		

Per calcular el coeficient de variació s'ha aplicat l'*Equació 11*⁶. *LA* és el valor límit acceptat, que en aquest cas és 103%, *n* és el número de rèpliques a realitzar, que és 6, i $Z_{(\alpha=0'01)}$ és 2'58⁶. Per tant, el coeficient de variació màxim acceptat per a la repetibilitat del mètode és 2'8%.

$$CV = |100 - LA| \cdot \frac{\sqrt{n}}{Z} \quad \text{Equació 11}$$

Per calcular l'interval de confiança s'ha aplicat l'*Equació 12*, on *s* és la desviació estàndard dels resultat, *n* el número d'anàlisi i *t* és la *t* de Student amb *n*-1 graus de llibertat i $\alpha=0'05$, que en aquest cas és 2'02¹¹. L'interval de confiança és 100'3 ± 0'5%.

$$\bar{x} \pm t \cdot \frac{s}{\sqrt{n}} \quad \text{Equació 12}$$

Optimització i validació d'un mètode d'anàlisi per a una especialitat farmacèutica

Donat que els percentatges de recuperació de les mostres i els valors màxim i mínim de l'interval de confiança es troben entre el 97'0% i el 103'0% de recuperació, i els coeficients de variació són menors al 2'8%, els resultats es troben dintre dels criteris d'acceptació. Per tant, es confirma que el mètode es repetitiu.

Repetibilitat del sistema instrumental

Taula 17. Resultats de l'anàlisi de la repetibilitat del sistema instrumental.

Mostra	Quantitat pesada de mostra (mg)	Quantitat injectada de mostra (µg)	Àrea del pic (mAU)	Recup. (%)	Mitjana (%)	CV (%)
MA100 (6)_1	10'93	0'818	8115	102'6	102'5	0'17
MA100 (6)_2		0'818	8115	102'6		
MA100 (6)_3		0'818	8121	102'6		
MA100 (6)_4		0'816	8098	102'4		
MA100 (6)_5		0'816	8101	102'4		
MA100 (6)_6		0'815	8086	102'2		

L'equació 13^e permet relacionar el coeficient de variació del mètode i del sistema instrumental⁶. Per tant, el coeficient de variació màxim acceptat per a la repetibilitat del sistema instrumental és 2'0%.

$$CV_{\text{mètode}} = CV_{\text{sistema}} \cdot \sqrt{2}$$

Equació 13

Donat que els percentatges de recuperació de les mostres es troben entre el 97'0% i el 103'0% de recuperació, i els coeficients de variació són menors al 2'0%, els resultats es troben dintre dels criteris d'acceptació. Per tant, es confirma la repetibilitat del sistema instrumental.

4.4.3.2 Precisió intermèdia

Tal i com s'explica a l'apartat 3.3.3.2, per avaluar la precisió intermèdia s'han utilitzat els resultats obtinguts en l'estudi de la linealitat i el rang, la repetibilitat del mètode i la selectivitat.

Els resultats dels tres anàlisi realitzats en tres dies diferents es troben a la Taula 18.

Optimització i validació d'un mètode d'anàlisi per a una especialitat farmacèutica

Taula 18. Resum de resultats per la precisió intermèdia.

Dia	Mostra	Recuperació (%)	Mitjana (%)	CV (%)	CV (%) TOTAL
1	MA100 (1)	101'3	100'8	0'48	
	MA100 (2)	100'5			
	MA100 (3)	100'5			
2	MA100 (1)	98'6	99'6	1'36	1'55
	MA100 (2)	101'1			
	MA100 (3)	99'0			
3	MA100 (1)	104'0	102'3	1'43	
	MA100 (2)	101'4			
	MA100 (3)	101'5			

Tots els coeficients de variació obtinguts, tant els valors individuals com el valor total, es troben per sota del 5'6% establert com a criteri d'acceptació. A més, totes les recuperacions es troben dins del rang establert de 97'0%-103'0%, a excepció del valor 104'0%.

No s'ha realitzat una repetició de la mostra amb un valor de recuperació de 104'0% perquè, com ja s'ha comentat, el coeficient de variació compleix les especificacions que requereix el paràmetre que s'estudia en aquest apartat (el coeficient de variació total es troba per sota del 5'6%) i, per aquest motiu, no ha sigut necessari repetir aquest anàlisi.

Per tant, es confirma que el mètode no presenta variabilitat entre diferents dies.

4.4.4 Exactitud

Per realitzar els càlculs necessaris per avaluar l'exactitud s'han utilitzat els resultats de la Taula 12 per als nivells de concentració MA80, MA100 i MA120. El percentatge de recuperació mitjà d'aquestes nou mostres és 101'1% i el coeficient de variació es 0'48%.

Els valors de recuperació de cada mostra i cada conjunt de mostres es troben en l'interval d'acceptació, que és 97% - 103%. A més, tots els coeficients de variació són inferiors al 2%, per tant, es troben dins dels criteris d'acceptació.

Tanmateix, s'ha realitzat un test de Cochran aplicant l'Equació 8 i s'ha obtingut una G_{exp} de 0'41. La G_{exp} és inferior a G_{tab} ($G_{tab} (\alpha=0'05, k=3, n=3) = 0'87$)¹¹, el que significa que les variàncies dels tres grups de mostres són homogènies i estadísticament equivalents, és a dir, que la concentració no és un factor influent en la variabilitat dels resultats.

Per tant, es confirma que el mètode és exacte.

4.4.5 Robustesa

Com s'explica a l'apartat 3.5.5, s'han estudiat els factors d'estabilitat de la solució tampó (A), temperatura de la columna (B), flux (C), longitud d'ona (UV) (D), volum d'injecció (E), pH de la solució tampó (F) i percentatge d'acetonitril en fase mòbil (G).

S'han analitzat vuit mostres, cadascuna amb unes condicions concretes (veure *Taula 6*), i s'han quantificat, cadascuna emprant la recta de calibratge corresponent entre les quatre elaborades. A la *Taula 19* els resultats. S'observa que cap mostra té recuperacions dintre dels paràmetres establerts i que la variabilitat entre els resultats és molt alta.

Taula 19. Resultats de l'anàlisi de la robustesa

Exp.	Quantitat pesada de mostra (mg)	Quantitat injectada de mostra (µg)	Àrea del pic (mAU)	Recup. (%)	Mitjana (%)	CV (%)
1	11'07	0'79	7590	112'3	100'4	11'1
2	11'00	0'96	9026	106'8		
3	11'08	0'61	5775	85'7		
4	11'03	0'66	6219	94'4		
5	11'06	0'85	7966	93'7		
6	10'99	1'03	9645	114'4		
7	11'08	0'80	7538	88'2		
8	11'06	0'78	7091	107'5		

Per avaluar la robustesa s'ha calculat l'efecte normalitzat de cada factor utilitzant l'Equació 14⁶ i s'ha comparat amb l'efecte màxim dels criteris d'acceptació, que en aquest cas, és un ±2%. $\sum Y(+)$ i $\sum Y(-)$ són la suma dels resultats d'un factor en l'extrem superior i inferior de l'interval definit, respectivament. $Y(0)$ és el valor nominal⁶, en aquest cas, un 100%.

$$\%Ex = \frac{2}{n} \cdot \frac{[\sum Y(+)-\sum Y(-)]}{Y(0)} \cdot 100 \quad \text{Equació 14}$$

A la *Figura 6* es mostren els efectes normalitzats de cada factor representats gràficament.

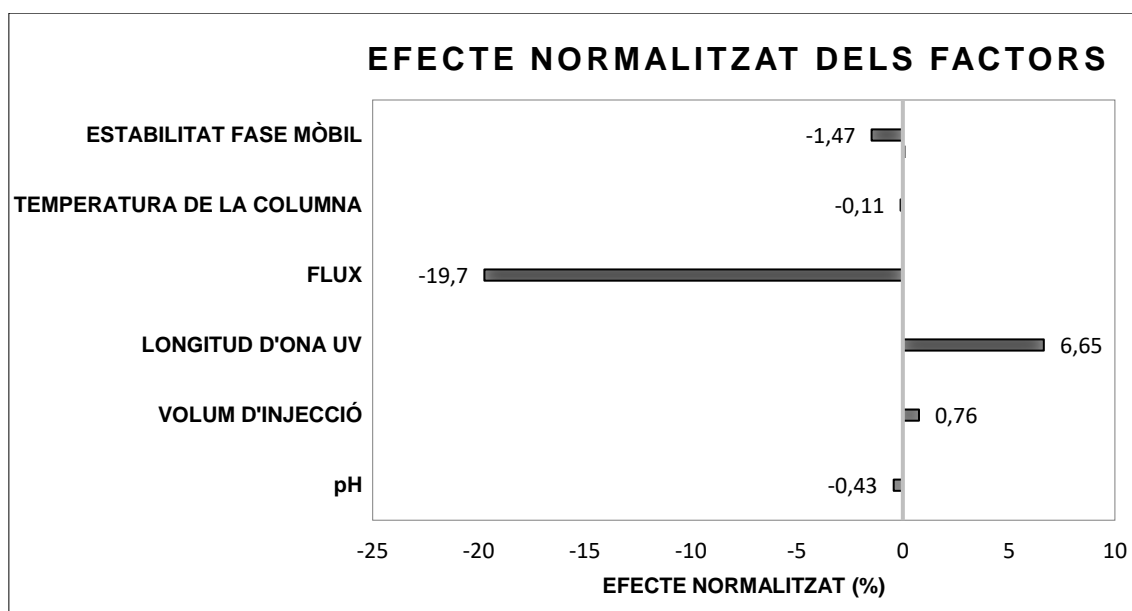


Figura 6. Representació gràfica dels efectes normalitzats de cada factor.

Com es pot observar, l'efecte del flux (C) i de la longitud d'ona (D) són significatius, ja que, en valor absolut, són superiors al 2%. Els altres factors no presenten una influència significativa i, en conseqüència, petites variacions d'aquests factors no alteraran el mètode d'anàlisi, és a dir, són robustos.

Per tant, tenint en compte que el flux i la longitud d'ona han de complir amb les condicions del mètode de forma estricta, el mètode analític és robust i fiable.

4.4.6 Estabilitat

Per avaluar la selectivitat s'ha calculat el coeficient de variació de les àrees obtingudes a l'analitzar la mostra i el patró en diverses ocasions al llarg de 24 hores. A la Taula 20 es mostren aquestes àrees i l'hora de mesura.

Taula 20. Resultats de l'anàlisi per l'estabilitat.

Temps	Àrea mostra MA100 (mAU)	Àrea patró (mAU)
0 h	7563	6799
8 h	7606	6842
12 h	7623	6773
24 h	7665	6850
CV (%)	0'55	0'54

Donat que ambdós coeficients de variació són inferiors al 5%, tant el patró com la mostra són estables durant 24 hores des de la seva preparació. Conseqüentment es podran realitzar seqüències d'anàlisi de llarga durada.

4.5 Anàlisi de mostres de l'especialitat farmacèutica

Aplicant els càlculs definits a l'apartat 4.1 als resultats de l'anàlisi de mostra real de l'especialitat farmacèutica, s'ha obtingut la informació de la *Taula 21*.

Taula 21. Dades de l'eix x i l'eix y per construir la recta de calibratge.

Volum injectat de patró (µl)	Quantitat pesada de patró (mg)	Quantitat injectada de patró (µg)	Àrea del pic
0'4		0'37	3596
0'8	100'11	0'73	6799
1'2		1'10	10283

A continuació s'ha construït una recta de calibratge. L'ordenada a l'origen és 206'1 (*Equació 2*) i la pendent és 9158 (*Equació 3*). Mitjançant aquesta recta de calibratge i els càlculs definits a l'apartat 4.1 s'han obtingut els resultats mostrats a la *Taula 22*.

Taula 22. Resultats de l'anàlisi de mostres de l'especialitat farmacèutica.

Mostra	Quantitat pesada de mostra (g)	Àrea del pic (mAU)	Recup. (%)	Mitjana (%)	CV (%)
Producte t=0 1	1'00043	7630	101'0		
Producte t=0 2	1'00105	7623	100'8	100'3	1'01
Producte t=0 3	1'00051	7494	99'2		
Producte t=36 1	1'00052	7537	99'7		
Producte t=36 2	1'00098	7510	99'3	99'5	0'24
Producte t=36 3	1'00020	7508	99'3		

Donat que els percentatges de recuperació de les mostres es troben entre el 97'0% i el 103'0% de recuperació, i els coeficients de variació són menors al 2%, els resultats es troben dintre dels criteris d'acceptació (veure *Taula 8*). Aquest fet indica que s'obtenen resultats satisfactoris a l'analitzar mostres de producte farmacèutic emprant el mètode validat. A més, tant les mostres recents (t=0 mesos) com les mostres caducades (t=36 mesos) presenten recuperacions dins de les especificacions.

5 CONCLUSIONS

Globalment, tant les recuperacions i/o concentracions de les mostres analitzades com els coeficients de variació de tots els grups de mostres es troben dintre dels criteris d'acceptació definits. En conjunt, els resultats dels tests estadístics realitzats indiquen que el mètode és selectiu, lineal en el rang estudiat, precís, exacte i robust, i les mostres i el patró són estables durant les primeres 24 hores des de la seva preparació.

En definitiva, es conclou que el mètode analític estudiat és adequat per l'anàlisi d'aquesta especialitat farmacèutica i, per tant, el mètode analític es dona per validat.

6 CONCLUSIONS

Overall, both the analysed samples recoveries and / or concentrations and the sample groups variation coefficients are among the defined acceptance criteria. Collectively, the performed statistical tests results prove the method to be selective, linear in the range studied, accurate, precise, and robust, and the samples and standard to be stable during the first 24 hours of its preparation.

In conclusion, the analytical method studied is suitable for this pharmaceutical specialty analysis and, therefore, the analytical method is validated.

7 BIBLIOGRAFIA

- (1) SP Veterinaria. Medicamentos y nutricionales para el sector veterinario <https://spveterinaria.es/> (accessed Apr 25, 2021).
- (2) R. Meyer, V. *Practical High-Performance Liquid Chromatography: Fourth Edition*; 2006; Vol. 3. <https://doi.org/10.1002/0470032677>.
- (3) Xu, Q. A. *Ultra-High Performance Liquid Chromatography and Its Applications*; 2013. <https://doi.org/10.1002/9781118533956>.
- (4) Eurachem. *La Adecuación Al Uso de Los Métodos Analíticos. Una Guía de Laboratorio Para Validación de Métodos y Temas Relacionados*; 2016.
- (5) ISO/IEC 17025. ISO/IEC 17025:2017, General Requirements for the Competence of Testing and Calibration Laboratories. ISO 2017.
- (6) Castro Cels, M.; Gascón Fora, S.; Pujol Forn, M.; Sanc Roca, J. M.; Vicente Plas, L. Validación de Métodos Analíticos. Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria 1989, pp 23–105.
- (7) European Medicines Agency. ICH Topic Q2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. *Prescrire International*. 2011, pp 2–6.
- (8) JCGM. International Vocabulary of Metrology. Basic and General Concepts and Associated Terms. *Chem. Int. - Newsmag. IUPAC* 2014. <https://doi.org/10.1515/ci.2008.30.6.21>.
- (9) L. Linda. Reviewer Guidance - Validation of Chromatographic Methods. *Center for Drug Evaluation and Research*. 1998, p 17.
- (10) Riu, J.; Boqué, R. Calibración Lineal. *Tec. Lab.* 2003.
- (11) Abraham, V. M.; Walpole, R. E.; Myers, R. H. Probability and Statistics for Engineers and Scientists. *Math. Gaz.* 1979, 63 (424). <https://doi.org/10.2307/3616039>.