

23
24



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

DESARROLLO DEL ALGORITMO DE UN SISTEMA
EXPERTO PARA VALIDACION DE METODOS
ANALITICOS EN LA INDUSTRIA FARMACEUTICA

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A :
MARIA DE LOURDES CERVANTES AYALA



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

MEXICO, D. F.



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

1998.

268474



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado asignado:

Presidente: Prof. Isaura Luisa Carrera García

Vocal: Prof. Rosa Lorenia Mora-Tovar y Chávez

Secretario: Prof. Juan Manuel Rodríguez

1er Suplente: Prof. Ma. Teresa Buentello Rodríguez


2do Suplente: Prof. Ricardo Rodríguez Sáenz.

Sitio donde se desarrolló el tema: Laboratorio 113, Departamento de Farmacia, División de Estudios de Posgrado. Facultad de Química.

Asesor del tema: M. en C. Juan Manuel Rodríguez

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'JM Rodríguez', written in a cursive style.

Sustentante: María de Lourdes Cervantes Ayala.

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'María de Lourdes Cervantes Ayala', written in a cursive style.

**"Es hermosa la frase de Agripa:
Jamás me serviré a mí mismo
de obstáculo . "...**

Epicteto.^a

^a Epicteto (55 d.C. - 135 d.C.), pensador griego cuya filosofía del estoicismo resaltó la libertad, la moral y la humanidad.

A Dios.

Quisiera brevemente expresar mis agradecimientos:

A mis padres: Lulú y Luis, no sólo por todo el amor y apoyo incondicional, o los recursos materiales y espirituales proporcionados incansablemente, sino por educarme en un ambiente de libertad y mostrarme día a día con actitudes de vida, que puedo lograr cualquier cosa con sólo pensarlo.

A mis hermanas: Mónica, Paula, Carmen y Luisa porque me considero afortunada por haber crecido juntas y se muy bien que sin ustedes nada sería igual.

A mis tíos Virginia, Edith y Rigoberto, por todo lo que con su ayuda y buena voluntad ha sido posible concretar.

A mi mejor amigo, cómplice y compañero: Jorge, por tu grandiosa voluntad, tu apoyo, amor y por toda la "efervescencia" que nos lleva a que todo adquiriera sentido de forma sorprendentemente natural.

A mis amigos: Gaby, Ingrid, Iliana, Bernardo, Carlos, Carlos R. M., Adolfo e Israel, por lo que juntos hemos compartido.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por la formación, los recursos, y por siempre proporcionarme un sin número de posibilidades.

A DGAPA por el apoyo otorgado para la realización de este trabajo.

Al M. en C. Juan Manuel Rodríguez por la dirección y todo el apoyo hasta ahora proporcionado en diversos proyectos.

Al jurado revisor: QFB. Rosa Lorenia Mora y QFB Isaura Carrera, por las valiosas observaciones que enriquecieron de forma importante el presente trabajo.

A los alumnos y profesores de Desarrollo Analítico, por todo lo que juntos hemos aprendido.

Tabla de contenido

CAPÍTULO 1	1
INTRODUCCIÓN.....	1
OBJETIVOS.....	3
CAPITULO 2	4
ANTECEDENTES	4
2.1 SISTEMAS EXPERTOS.....	4
2.1.1 Definición y aplicaciones de los Sistemas Expertos.....	4
2.1.2 Arquitectura de los Sistemas Expertos.....	4
2.2 ANTECEDENTES GENERALES EN VALIDACION DE METODOS ANALITICOS.....	7
2.2.1 Validación de Métodos Analíticos. Consideraciones Generales.....	17
2.2.2 Estrategias de Validación.....	18
CAPITULO 3	25
METODOLOGIA	25
3.1 Desarrollo del algoritmo.....	25
3.1.1 Modelo del Ciclo de vida.....	25
3.1.1.1 Planeación de la validación.....	26
3.1.1.2 Requerimientos de Validación.....	26
3.1.1.3 Ensayo y documentación de la validación.....	28
3.1.1.4 Cambios y revalidación.....	28
3.2 Validación del algoritmo.....	28
3.2.1 Casos de estudio.....	29
CAPITULO 4	30
RESULTADOS	30
4.1 Desarrollo del Algoritmo.....	30
4.1.1 Modelo del Ciclo de Vida.....	30
4.1.1.1 PLANEACION DE LA VALIDACION.....	30
4.1.1.2 REQUERIMIENTOS DE VALIDACION.....	31
4.1.1.3 ENSAYO Y DOCUMENTACION DE LA VALIDACION.....	40
4.1.1.4 CAMBIOS Y REVALIDACION.....	41
4.2 Validacion del Algoritmo.....	42
CAPITULO 5	43
ANALISIS DE RESULTADOS	43
CAPITULO 6	51
CONCLUSIONES	51

ANEXO 1 DIAGRAMAS DE FLUJO.....	54
DFPPAL.....	53
DFREV.....	59
DFESP.....	66
DFLIN.....	67
DFEXAC.....	69
DFLOD.....	70
DFLOQ.....	71
DFPREC.....	72
DFROB.....	75
DCALCLIN.....	76
DCALCEXA.....	81
DCALCREP.....	84
DCALCREPR.....	86
DCALCLOD.....	90
DCALCLOQ.....	93
DCALCROB.....	96
ANEXO 2. RESULTADOS DE LA VALIDACION DEL ALGORITMO.	101
ANEXO 3. COMPARACION DE RESULTADOS OBTENIDOS POR EL ALGORITMO Y REPORTADOS PARA CADA CASO DE ESTUDIO.....	163
BIBLIOGRAFIA	182

Capítulo 1

Introducción

Los laboratorios para el análisis farmacéutico se encargan de aplicar técnicas y métodos analíticos para evaluar la calidad de los productos farmacéuticos, intermediarios, e insumos necesarios para la fabricación de los mismos. Para realizar lo anterior, se debe contar con métodos analíticos validados.

El proceso de validación en el análisis farmacéutico es esencial para asegurar que el nuevo o recién implantado método es capaz de llevar a cabo el análisis dentro de la exactitud y precisión requerida. Los experimentos de validación requieren de una planeación cuidadosa y son seleccionados tomando en cuenta el propósito, condiciones, requerimientos específicos para el análisis y el ambiente regulatorio. Cabe además enfatizar que la validación de métodos analíticos está tomando gran importancia en la industria farmacéutica, por varias razones:

- Por ser un instrumento esencial para asegurar que un producto farmacéutico cumple con especificaciones de identidad, contenido y pureza establecidas para el uso
- El estricto control de las agencias regulatorias

El Desarrollo y la Validación de Métodos analíticos se ejecuta por personal experimentado y altamente especializado, lo cual puede limitar la disponibilidad de los recursos humanos en un Laboratorio Farmacéutico. El contar con un soporte para el personal que no es altamente especializado, optimizaría el trabajo a realizar con los recursos humanos disponibles.

Los sistemas expertos involucran en una computadora el conocimiento base y los mecanismos de inferencia necesarios para resolver problemas de manera similar a como un experto los resolvería.

Tomando en cuenta las consideraciones anteriores, un Sistema experto es una aplicación conveniente para la validación de métodos analíticos, ya que el proceso de validación está cobrando gran importancia tanto en la investigación como en la industria farmacéutica y la línea de razonamiento o algoritmo para dicho proceso no puede ser expresada por medio de relaciones matemáticas simples. En México no se ha desarrollado información sobre sistemas expertos de aplicación en ciencias farmacéuticas, de tal manera que este trabajo tiene como finalidad desarrollar el algoritmo que sirva como la herramienta básica para la etapa de programación e iniciar este tipo de desarrollos que permitirán a personal no especializado en el área, contar con un soporte que les oriente para su trabajo diario.

El alcance del sistema experto para el cual se desarrollará el algoritmo, es la validación de métodos analíticos farmacéuticos, independientemente del método experimental o instrumental utilizado. La estrategia de validación elegida es la de aproximación al ciclo de vida, propuesta por Hokanson et al¹⁵ y descrita en el capítulo 2 de esta tesis.

Cabe mencionar que este trabajo constituye solamente una parte de la línea de investigación en sistemas expertos, las siguientes etapas deberán considerar la selección del sistema y/o lenguaje en el cual se programará el algoritmo, la programación del prototipo y la validación del sistema confrontándolo con problemas de validación en el laboratorio.

OBJETIVOS

Objetivo General.

- Desarrollar el algoritmo para un sistema experto en validación de métodos analíticos que cumpla con los siguientes requerimientos:
 - Asesorar acerca del nivel de validación requerido
 - Asesorar acerca de los procedimientos, pruebas y el diseño experimental para requerimientos de validación específicos
 - Realizar los cálculos necesarios
 - Interpretar los resultados y diagnosticar problemas potenciales

Objetivos Particulares.

- Llevar a cabo la adquisición y sistematización del conocimiento base.
- Elaborar la representación formal del conocimiento base por medio del uso de diagramas de flujo para el desarrollo del algoritmo del sistema experto.
- Llevar a cabo la validación del algoritmo desarrollado.

CAPITULO 2

ANTECEDENTES.

2.1 SISTEMAS EXPERTOS.

2.1.1 Definición y aplicaciones de los Sistemas Expertos.

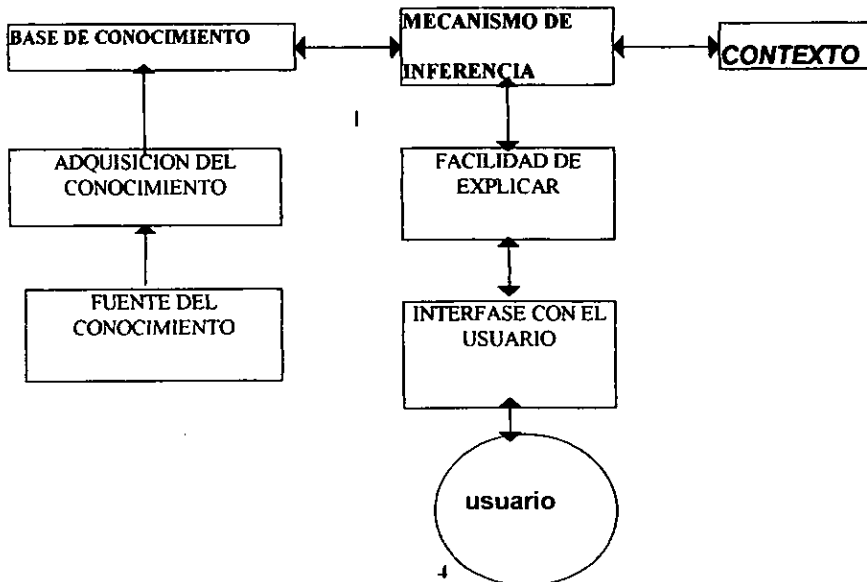
Un sistema experto se define como un programa computacional que proporciona asesoría inteligente para la resolución de un problema específico, emulando al proceso de resolución de un experto en el campo²⁷. La aplicación principal de los sistemas expertos se encuentra en la resolución de problemas que no pueden ser representados por medio de algoritmos matemáticos, es decir problemas que son resueltos principalmente con base a la experiencia.

Un sistema experto tiene tres componentes principales:¹²

Base de conocimiento
Mecanismo de inferencia
Interfase con el usuario.

Los cuales interactúan entre si dentro de un contexto específico.

Esquemáticamente, se puede representar un sistema experto de la siguiente manera:



El conocimiento base contiene todos los hechos, reglas y bases teóricas específicas para la resolución del problema, el contexto es el componente que define los parámetros del problema en un entorno proporcionado por el usuario; el mecanismo de inferencia es la unidad lógica con la que se extraen conclusiones de la base de conocimientos, según un método de solución de problemas que está configurado imitando el procedimiento humano de los expertos para solucionar problemas. La interfase es el medio por el cual se establece el contacto entre el conocimiento base y el usuario con una problemática específica dentro de un ambiente amigable.

Las diferencias principales entre un sistema experto y un programa convencional son: el mecanismo de inferencia, el cual le permite tomar decisiones y dar asesoría "inteligente", además el sistema experto puede justificar su propio mecanismo de toma de decisiones a petición del usuario.⁴

La aplicación de los Sistemas Expertos será adecuada donde los expertos dispongan de conocimientos complejos en un área delimitada y donde no existan algoritmos elaborados o donde los existentes no puedan solucionar algunos problemas. Este tipo de problemas se caracteriza además por el hecho de que, aunque es posible la existencia de una o más soluciones, la vía de solución no está previamente fijada. Sin embargo, el experto encuentra una solución al problema gracias a la información que posee sobre el problema y a su experiencia. Mientras esta solución sea susceptible de repetición y el planteamiento del problema esté claro, existe un razonamiento que puede ser reproducido por un sistema experto.

Debido a que la estructuración e implementación del conocimiento del experto requiere una gran cantidad de trabajo, sólo valdrá la pena realizar el esfuerzo de crear un Sistema Experto cuando un conocimiento sea válido durante un largo espacio de tiempo y vaya a ser utilizado por el mayor número posible de personas.

Los sistemas expertos se han utilizado en varios campos del conocimiento, entre los cuales destacan la arquitectura, la electrónica y la medicina. En la tabla 1 se muestran los sistemas expertos más utilizados en el año de 1988.³⁶

SISTEMA EXPERTO	APLICACIÓN	DESARROLLADO POR
Programa de diagnóstico proteico en suero	Electroforesis proteica en suero	Helena Labs/Rutgers
PUFF	Pruebas de función pulmonar	Centro Médico Stanford
CADUCEUS	Diagnóstico en medicina interna	U. de Pintsburgh
MYCIN	Terapia antimicrobiana	Stanford
DENDRAL	Espectroscopia de masas	Stanford
ACE	Mantenimiento de cables telefónicos	Bell Labs

Tabla 1. Sistemas expertos más utilizados en 1988. Weiss Sholom M. (36)

Hasta el año de 1990 se tienen registrados 4024 sistemas expertos en diversas áreas, ³⁶ y es a partir de 1987 que los sistemas expertos se han utilizado en el campo del Análisis Químico, con la creación del proyecto ESCA. (Expert Systems in Chemical Analysis). Este grupo está formado por: Phillips Scientific, Cambridge, Free University Brussels , Bélgica, Catholic University Nijmegen, y Phillips Research Hamburgo. Los objetivos principales de este grupo son proveer Sistemas expertos a laboratorios analíticos, mostrar los beneficios que los sistemas basados en conocimiento pueden proveer en esta área y propiciar el intercambio de información entre la investigación y la industria para la creación de sistemas (Leeuwen, van J.A.) .⁴

Existen varias razones del por qué el análisis químico en la industria farmacéutica es un área apropiada para la aplicación de sistemas basados en el conocimiento o sistemas expertos. En la industria farmacéutica la investigación y desarrollo de nuevos fármacos y medicamentos se está incrementando considerablemente, y como consecuencia, un gran número de compuestos debe ser analizado en las diferentes etapas de desarrollo de un producto nuevo, siendo frecuentemente el tiempo uno de los factores más importantes.³³ Hasta el momento el desarrollo y la validación de métodos

analíticos son ejecutados por expertos, los cuales utilizan las computadoras principalmente para procesar el resultado de los experimentos. Las estrategias de los expertos en este campo están basadas en su juicio científico, el razonamiento lógico y los conocimientos adquiridos por experiencia, sin embargo dichos conocimientos no están siempre accesibles, lo cual puede limitar la disponibilidad y efectividad de los recursos humanos en el área de desarrollo. Por otro lado, las herramientas computacionales disponibles en el laboratorio, generalmente son paquetes de estadística y matemáticas que si bien elaboran todos los cálculos necesarios para el procesamiento de datos, no son capaces de interpretar o diagnosticar problemas en base a resultados. En este sentido, los sistemas expertos resultan ser herramientas muy aplicables, toda vez que pueden acelerar el proceso desde las etapas de desarrollo, y optimización hasta la validación del método, con los recursos humanos disponibles.

Con el apoyo y auspicio del proyecto ESCA (Expert Systems for Chemical Analysis), se han elaborado sistemas expertos para el desarrollo de métodos analíticos en la industria farmacéutica; Buydens et al en 1990, describen un sistema para desarrollo de métodos espectrofotométricos ⁴, Luinge, H.J. et al, en 1990 desarrollaron un sistema experto para análisis estructural a partir de datos obtenidos de espectro infrarrojo y espectrometría de masas ²⁵. Recientemente, se han reportado aplicaciones exitosas tanto en el desarrollo (Conti, P. et al y S. S. Williams) ⁹, como en la validación de métodos por cromatografía de líquidos de alta resolución. (Mulholland M. et al). ^{5,26}

2.1.2 Arquitectura de los Sistemas Expertos

Durante el desarrollo de un sistema experto se reconocen cuatro etapas principales: ²⁶

1.- Etapa de adquisición del conocimiento.

En esta etapa se plantean las metas y alcance operativo del sistema experto. No es conveniente utilizar un sólo sistema para la resolución de algoritmos o problemas largos, pues mientras más grande y más requerimientos tenga un sistema, mayores son las posibilidades de falla y con el tiempo se convierte en una aplicación poco robusta. En caso de procesos largos, lo más conveniente es dividirlos en etapas y

crear sistemas independientes pero relacionados para cada etapa. A este respecto, Buydens et al reportan cuatro sistemas expertos interrelacionados para el desarrollo de un método analítico por HPLC con una base de datos estructural común, tal como se muestra en la figura 1:

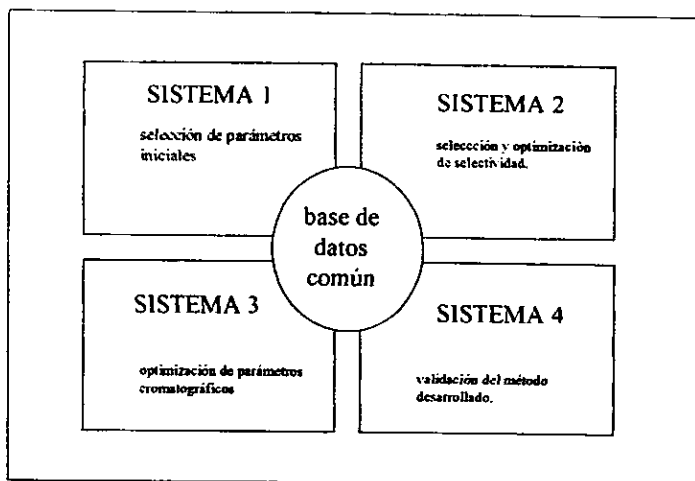


figura 1. Sistemas expertos relacionados. Buydens, et al^{4,5}

Una vez que los objetivos y el alcance del sistema se han establecido, se reúne y organiza la información que formará la base del conocimiento de fuentes tales como expertos reconocidos en el campo, bibliografía, casos de estudio etc. Se sistematizan las reglas y líneas de razonamiento en una forma lógica. Esta es la etapa limitante en el proceso de desarrollo de un sistema experto, ya que se requiere reunir los esfuerzos del experto en conocimiento y del experto programador. Generalmente el experto en conocimiento no está completamente familiarizado con el proceso de desarrollo de sistemas y el programador tiene inicialmente muy poco o escaso conocimiento acerca del tema sobre el que debe realizar la aplicación. No se pretende bajo ninguna circunstancia que el programador se convierta en experto del conocimiento ni que el experto se convierta en un programador, en realidad es preciso implementar estrategias para que se represente el conocimiento base de tal forma, que el programador pueda traducirlo en el sistema y que a su vez, el experto entienda la forma de

esquematizar las reglas y líneas de razonamiento para que los objetivos se cumplan.

Para lograr lo anterior se recomienda que desde el inicio del proyecto se organicen reuniones entre el ingeniero en programación y el o los expertos, usualmente con una tercera o incluso cuarta persona presente relacionada con el campo de conocimiento elegido, con la función de moderador. Las primeras series de pláticas deben ser dirigidas a que el ingeniero en sistemas obtenga una clara idea de las implicaciones y alcance de la base de conocimiento; asimismo, el proceso y las etapas del proceso deben ser definidas en un contexto general. Adicionalmente el experto debe familiarizarse con el lenguaje y herramientas utilizadas en sistemas y la expresión lógica del razonamiento. Es recomendable que la adquisición, representación y programación se vaya haciendo por etapas, de esta forma, el experto y el programador van constatando en cada paso que el conocimiento se ha interpretado y representado correctamente, y en caso de no ser así, los problemas se van resolviendo de manera continua ²⁶

Es importante señalar que en esta etapa se elige el programa, lenguaje, sistema y base de datos, con la cual se programará seleccionando dichas herramientas en base a las necesidades del usuario, los recursos informáticos y electrónicos necesarios y la cantidad de información.

Una gama completa de herramientas se encuentran disponibles en el mercado, desde sistemas sencillos y baratos, hasta programas sofisticados. Existen desde los sistemas convencionales para programación y manejo de bases de datos, hasta sistemas comerciales con herramientas especiales para elaboración de sistemas expertos. Entre las herramientas convencionales se encuentra: Fortran, Dbase, Basic, Clipper, etc. y entre las herramientas especialmente diseñadas para elaboración de sistemas expertos se encuentra: Goldworks ©, MYLOG©, DEE©, Delfi2©, Knowledge Craft©. ²⁶

2.-Etapa de representación formal de la información o conocimiento base

En esta etapa, por medio de diagramas se establece el flujo y manejo de

información así como el mecanismo de inferencia. Mulholland et al²⁶ muestran en su trabajo de investigación el uso de dos tipos de diagramas: los diagramas de flujo de datos DFDs (Data Flow Diagrams) y los diagramas de estados de transición STDs (State Transition Diagrams), dichos diagramas pueden ser utilizados en forma independiente, pero son especialmente útiles cuando se utilizan juntos. Los DFDs, (figura 2) son utilizados para representar el flujo de datos en un proceso, así como las entradas y salidas de información; con el uso de estos diagramas el proceso puede ser dividido en subprocesos y a su vez cada subproceso puede ser representado con un DFD; de esta forma la variable de entrada de un subproceso resulta ser un dato de salida del subproceso anterior, sin embargo, con el uso de estos diagramas de flujo no se puede observar esquemáticamente el mecanismo de inferencia en un momento dado del proceso, ya que los puntos importantes en donde se toman decisiones no son representados con detalle con este tipo de herramienta. Para esta finalidad, se utilizan los diagramas de transición STDs.

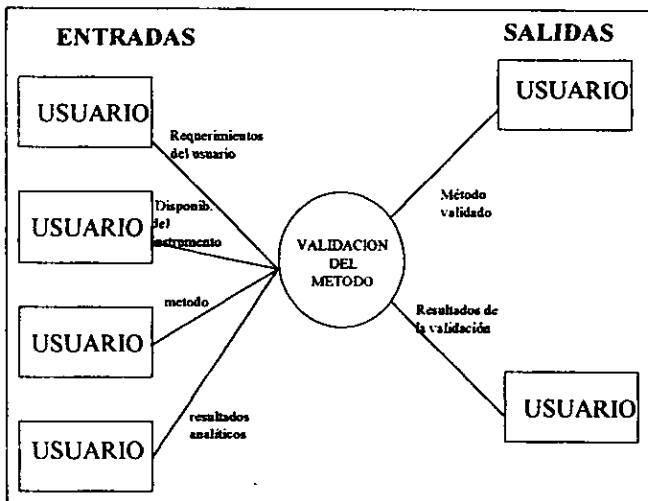


figura 2. Diagrama de flujo de datos. Mulholland M. et al²⁶

Los diagramas STDs, se refieren a etapas específicas del proceso en las que se toman decisiones sustentadas en el conocimiento base, dichos diagramas son generados a partir de los DFDs e indican claramente la interacción entre el conocimiento base y las reglas programadas que dan como resultado decisiones en

el sistema. Un ejemplo de diagrama de transición se muestra en la figura 3.

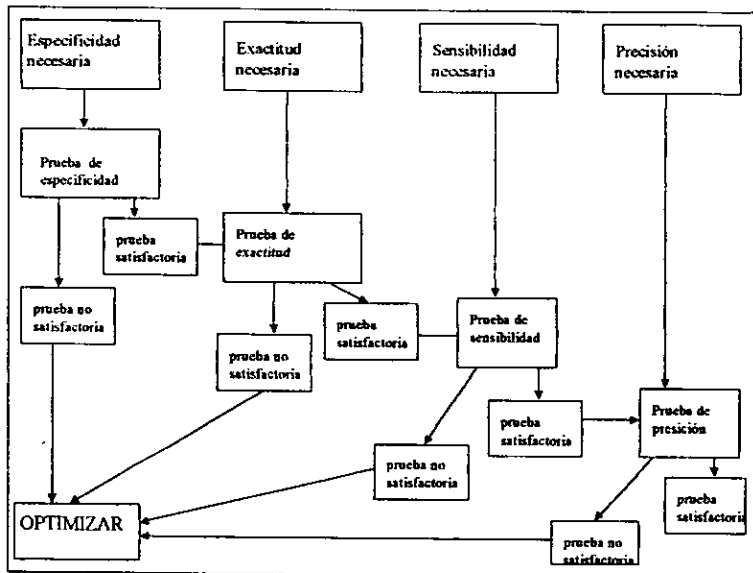


figura 3. Diagrama de transición de estado. Mulholland M. et al ²⁶

Sin embargo, no sólo los diagramas de flujo son herramientas adecuadas para la representación del conocimiento. El conocimiento base puede ser también representado por medio de reglas lógicas que pueden ir desde proposiciones conectadas entre sí por condicionales (si, entonces), hasta la representación formal gráfica mediante el uso de árboles de decisiones.

Un árbol es una representación gráfica en la cual los hechos o preguntas se colocan en los nodos, cada nodo contiene múltiples respuestas que se denominan ramas y las ramas a su vez pueden conducir a subnodos. ³³ (figura 4). Los algoritmos a los cuales pueden aplicarse son recursivos. El principio general está basado en definir un registro con uno o más campos de información. Cada punto tiene una localización específica y los parámetros que define cada uno difieren y discriminan unos de otros. La ventaja de utilizar árboles de decisión para programación de sistemas expertos es que cuando por alguna razón la localización especificada por parámetros no tiene sentido acorde a la base de datos, entonces se crea una nueva

localización. con lo cual, desarrollando la base de datos apropiada, se puede lograr que el sistema tenga crecimiento autónomo. Por el contrario, cuando la localización especificada tiene sentido, el sistema puede proporcionar la información existente y preguntarle al usuario en qué dirección se debe dirigir la consulta. Vankeerbefghen P. et al,³³ muestran la aplicación de árboles de decisión en el desarrollo de un sistema experto para la selección apropiada del detector en HPLC.

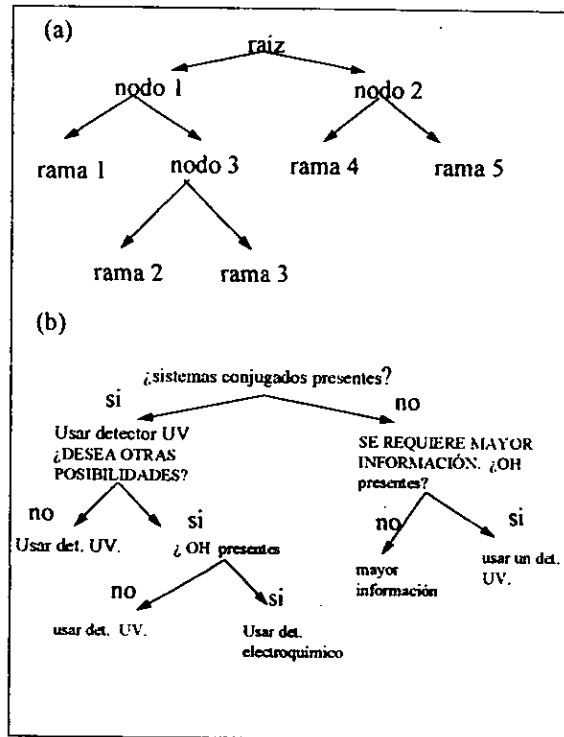


figura 4. (a) árbol de decisión general. (b) árbol de decisión para selección del detector en HPLC. Vankeerbefghen et al³³

Es deseable que antes de entrar a la etapa de programación se valide la base de conocimientos y todos los algoritmos desarrollados para estar convencidos de que la representación formal del conocimiento es la adecuada, y optimizar tiempo y recursos en la etapa de programación. Para lograr ésto, se plantean problemas específicos y tratan de resolverse únicamente utilizando el algoritmo, de esta forma, el experto podrá

identificar posibles errores o inconsistencias en el proceso y una vez concluida la etapa, el proceso de programación y validación será más sencillo.

3. Programación del sistema experto prototipo.

En esta parte, el experto programador, elabora la primera versión del sistema, es importante la colaboración del experto en conocimiento y si es posible, de el o los futuros usuarios, para resolver los problemas de adecuación y para que se lleve a cabo la programación y optimización del sistema en función de las necesidades y acorde a los objetivos planteados. Las herramientas de programación más comúnmente utilizadas en la literatura son Delphi2[®] y Gold works[®],^{4,5,10,26} ya que son programas especialmente diseñados para el desarrollo de sistemas expertos, y generalmente las aplicaciones deseadas son con fines comerciales.

Al programar el prototipo se deben de plantear las siguientes preguntas:

- ¿Qué objetos serán definidos?, ¿Cómo se formularán las reglas?, ¿La base de conocimientos hace totalmente referencia a la solución del problema?, ¿La base de conocimientos es consistente?, ¿Qué preguntas se plantean y por qué?, ¿Cómo ha llegado el sistema a soluciones intermedias?, ¿Cómo debe responder el usuario a las preguntas planteadas?, ¿Cómo se mostrarán las respuestas del sistema a las preguntas que se planteen?

Adicionalmente se debe tomar en cuenta que otros requerimientos del sistema son:

- El sistema debe ser independiente en la medida posible.
- El aprendizaje del manejo del sistema debe ser rápido.
- Debe evitarse en lo posible la entrada errónea de datos.
- Los resultados deben presentarse en forma clara.
- Las preguntas y explicaciones deben ser comprensibles.

4. Validación del sistema experto.

En esta etapa se lleva a cabo la validación del sistema y la confrontación del prototipo a las necesidades específicas del área de trabajo, evaluación y cambios. Se debe evaluar:

- 1) Confiabilidad del Sistema.
- 2) Seguridad del Sistema.
- 3) Nivel de Cumplimiento de Satisfacción del Sistema.

La evaluación de un sistema experto puede ser dividida en dos etapas. (Buydens, et al)⁵. En la primera etapa se debe verificar si el sistema contiene y refleja el conocimiento del experto: El experto debe estar de acuerdo con los resultados que el sistema produce para casos de estudio específicos. En el proyecto ESCA los sistemas son evaluados mediante estudios ciegos, con un determinado número de casos de estudio que deben ser resueltos tanto por el sistema experto como por el experto humano de forma independiente y en orden aleatorio, comparándose la similitud de resolución con parámetros predefinidos. Este tipo de verificación se lleva a cabo también con respecto al tiempo, se plantean ciclos en los cuales un cierto número de casos son introducidos y resueltos; transcurrido cierto tiempo se vuelven a introducir con la finalidad de investigar si la base de conocimientos o incluso el mecanismo de inferencia es afectado con el uso continuo. Si se requiere, la parte matemática del sistema experto (cálculos etc) puede ser evaluada comparando resultados obtenidos por el sistema con aquellos obtenidos realizando dichas operaciones en una hoja de cálculo o procesador validado.

La segunda etapa involucra la aceptación del sistema experto en el sitio de trabajo. El principal criterio de evaluación es la interfase con el usuario, enfocándose hacia la capacidad y facilidad de explicar, la seguridad del sistema, la estabilidad y robustez del mismo. Lo anterior se logra probando el sistema en el sitio de trabajo por períodos de tiempo prolongado, y al ser el usuario y la interfase el objetivo principal, se puede evaluar llevando a cabo encuestas a diferentes usuarios a cerca del nivel de cumplimiento y satisfacción del sistema.

Adicionalmente, entre los objetivos principales de la validación de sistemas en la industria farmacéutica está el asegurar que tanto el hardware como el software sean estables con el tiempo, el control adecuado de acceso a los programas fuentes por los usuarios, y que los documentos emitidos por el sistema, se lleven a cabo conforme al proceso de documentación indicado por la Buenas Prácticas de Documentación. (Protocolos, cálculos e informes).

Consideraciones del Hardware³: Se deben definir y evaluar las especificaciones que debe cumplir el equipo tales como: espacio de memoria requerido, otros paquetes o procesadores que puedan ser utilizados, e interfases adicionales. Este tipo de validación debe llevarse a cabo al momento de la instalación del sistema en el área de trabajo. Por otra parte, deben también considerarse otros requerimientos propios al diseño de la base de datos del sistema como: manejadores, simuladores, y archivos fuente especiales.

Todos los parámetros anteriormente mencionados así como la estrategia de validación y las especificaciones deben ser integrados a un protocolo de validación del sistema, el cual debe estar elaborado y aprobado antes de iniciar el proceso.

En el siguiente esquema se muestran las etapas y calendarización aproximada de desarrollo de un Sistema Experto para validación de métodos cromatográficos, según Mulholland M. et al ²⁶

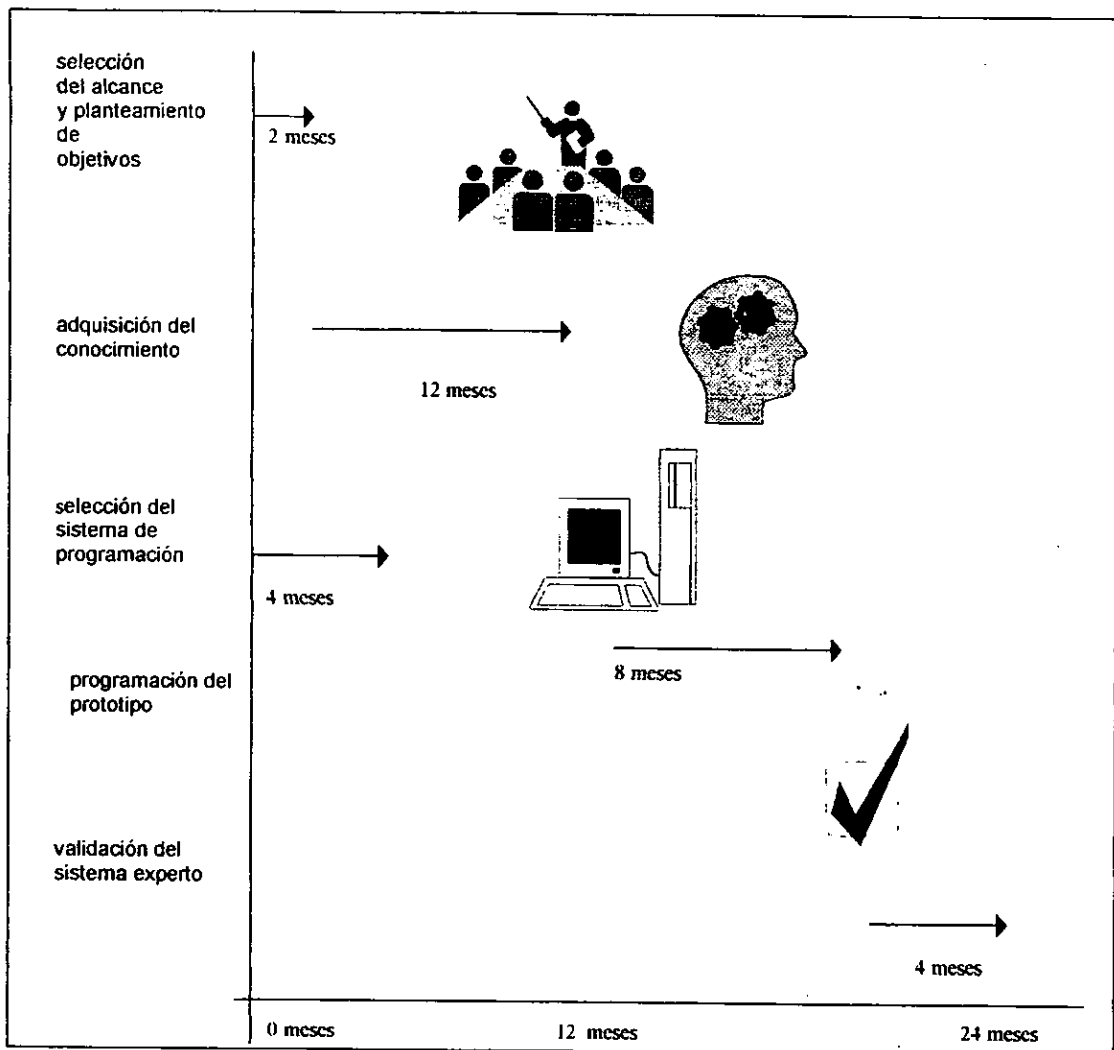


Figura 5. Calendarización aproximada para desarrollo de un sistema experto. Mulholland et al.

ANTECEDENTES GENERALES EN VALIDACION DE METODOS ANALITICOS

2.2.1 Validación de Métodos Analíticos.

2.2.1.1 Consideraciones Generales

Tal como lo establece el CIPAM⁸ (Comité Interinstitucional de Prácticas Adecuadas de Manufactura), la validación se define como el proceso por el cual queda establecido, por estudios de laboratorio que la capacidad del método satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas, la FDA (Food and Drug Administration) indica que validación es el establecimiento de evidencia documental la cual provea con alto grado de aseguramiento que un proceso produce productos en forma consistente de acuerdo a especificaciones de calidad ^{17,18}

El punto más importante dentro de las definiciones anteriores es el hecho de que la validez de un método únicamente puede ser demostrada a través de estudios de laboratorio y dichos estudios deben ser adecuadamente seleccionados y planeados para que los resultados, sean capaces de demostrar que el método cumple con los objetivos para los cuales fue desarrollado. En este aspecto es importante aclarar que el proceso de validación no es una "caja mágica" que proporcione datos analíticos confiables en demanda, dicho proceso, es la evidencia del desempeño del método e independientemente de los aspectos regulatorios, debe estar basado en el juicio científico correcto, tanto para la planeación y ejecución, como para la interpretación estadística de los resultados.

2.2.1.2 Aspectos Regulatorios

Las regulaciones actuales en buenas prácticas de manufactura establecen que los métodos de análisis utilizados para evaluar el cumplimiento de los productos farmacéuticos con especificaciones establecidas deben cumplir estándares apropiados de exactitud y confiabilidad (Code of Federar Regulations). La regulación mexicana también establece la necesidad de que los métodos utilizados para la evaluación de productos farmacéuticos estén validados "...Los controles deberán incluir en su caso: La comprobación del resultado y la validación de cualquier técnica empleada;..." (artículo 1127 Ley General de Salud). La NOM-059-SSA1-1993 establece en el apartado 9.11.3 "Los métodos analíticos deben ser validados, de acuerdo con lo establecido en el apartado 9.12 Control de laboratorio Analítico".

Para cumplir con la reglamentación se han publicado diversas guías de validación para métodos analíticos: La FDA en 1985 emite una guía para validación de métodos analíticos ¹¹, de la misma forma México (1988), la USP 23 en su capítulo general 1225, la Comunidad Europea (1990) y Canadá 1992, emiten Guías para procedimientos y terminología de validación en métodos analíticos. Finalmente, en 1995 la FDA publica una guía titulada "Validación de procedimientos analíticos: Metodología", auspiciada por la Conferencia Internacional de Armonización ICH, ^{17,18} en la que colaboran representantes de la Comunidad Europea, Japón, Estados Unidos y Canadá entre otros. En dicha guía se presenta una discusión de las características que deben ser consideradas durante la validación de procedimientos analíticos, tomando como base los requerimientos regulatorios de Europa, Estados Unidos y Japón, adicionalmente se proveen recomendaciones para la elección de los parámetros de Calidad que deben considerarse para cada método analítico. Desafortunadamente no se ha publicado información regulatoria acerca de cómo conducir un proceso de validación (secuencia de ensayos, nivel requerido etc), y la planeación del diseño experimental asociado ²⁰.

2.2.2 ESTRATEGIAS DE VALIDACION

Se han publicado varias estrategias de validación para métodos analíticos, (Lang.J.R; y Hokanson et al,)^{15,16} y ²² y básicamente se reconocen dos alcances principales: La estrategia Convencional o Clásica²² y la de Aproximación Al Ciclo de Vida^{15,16}. A continuación se revisarán ambas estrategias, no obstante la que se utilizará en el presente trabajo es la de Aproximación al Ciclo de Vida.

2.2.2.1 ESTRATEGIA CLASICA²²

Básicamente la estrategia clásica se compone de dos etapas: Prevalidación y Validación

2.2.2.1.1 Prevalidación.

Antes de llevar a cabo la validación, el proceso de prevalidación proporciona al analista la oportunidad de obtener experiencia práctica con el método (en caso de no tenerla), y ayuda a identificar las condiciones analíticas óptimas. Además en esta etapa se deben seleccionar los requerimientos de validación y los experimentos a realizar, se debe establecer el modelo de regresión, y evaluar la estabilidad del sistema; el esquema

de extracción-recuperación debe ser optimizado de tal forma que la recuperación y la reproducibilidad sean las adecuadas.

2.2.2.1.2 Validación.

El proceso de validación consiste en llevar a cabo experimentalmente y documentar las pruebas establecidas en los estudios de prevalidación. Lang J.R.²², reporta que una de las formas adecuadas de hacerlo es efectuar cuatro comidas analíticas llevadas a cabo en dos días diferentes e involucrando dos analistas. Cada uno de los analistas tiene funciones específicas de tal modo que entre los dos, lleven a cabo la experimentación necesaria para evaluar los parámetros de calidad predeterminados (especificidad, linealidad, exactitud, precisión robustez) . Se analizan muestras problemas y muestras añadidas con sustancias que potencialmente puedan interferir en el proceso analítico: metabolitos, productos de degradación, componentes de la formulación etc. Adicionalmente se analizan muestras estándares denominadas muestras Control de Calidad. Se deben tomar en cuenta factores externos al método que puedan interferir, tales como el almacenamiento, proceso, y manipulación de la muestra previo al análisis, con la finalidad de evidenciar su estabilidad y finalmente, a partir de los datos generados, se lleva a cabo el análisis estadístico, se comparan los resultados obtenidos contra las especificaciones establecidas y se determina si los parámetros son válidos emitiendo un reporte de validación. El modelo general para la estrategia mencionada se muestra en la figura 6

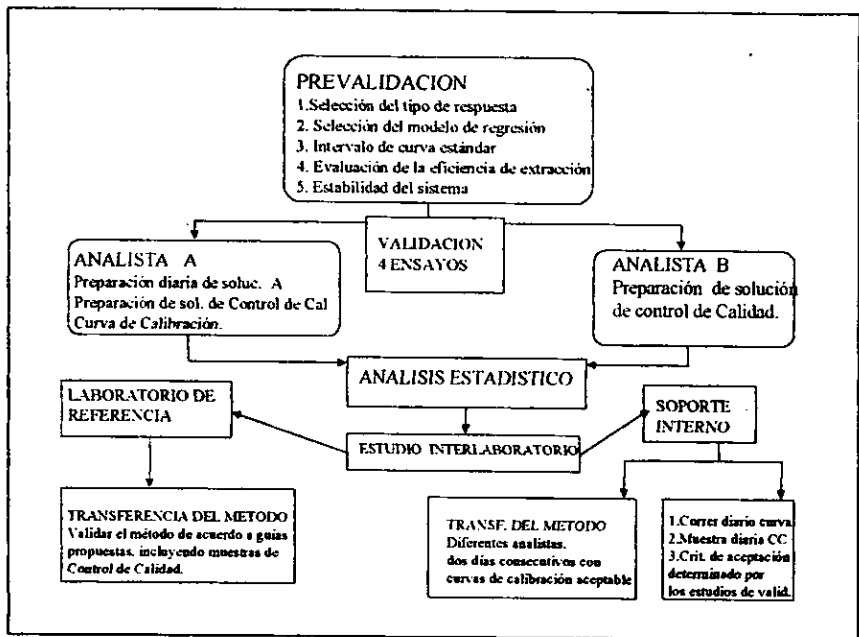


Figura 6. Estrategia clásica para validación de Métodos Analíticos. Lang J.R.²²

2.2.2.2 APROXIMACION AL CICLO DE VIDA ^{15,16}

El término "Aproximación al Ciclo de Vida" es ampliamente conocido y utilizado en validación de sistemas computarizados. Actualmente Hokanson et al^{15,16} proponen la aplicación de dicho concepto al proceso de validación de métodos analíticos en la industria farmacéutica, observando al proceso de validación, como continuo durante el ciclo de vida de un método. Dicha estrategia consiste básicamente en cuatro etapas: El Proceso de Planeación, Requerimientos de Validación, Ensayo y Documentación de la Validación, y Cambios y/o Necesidad de Revalidación.

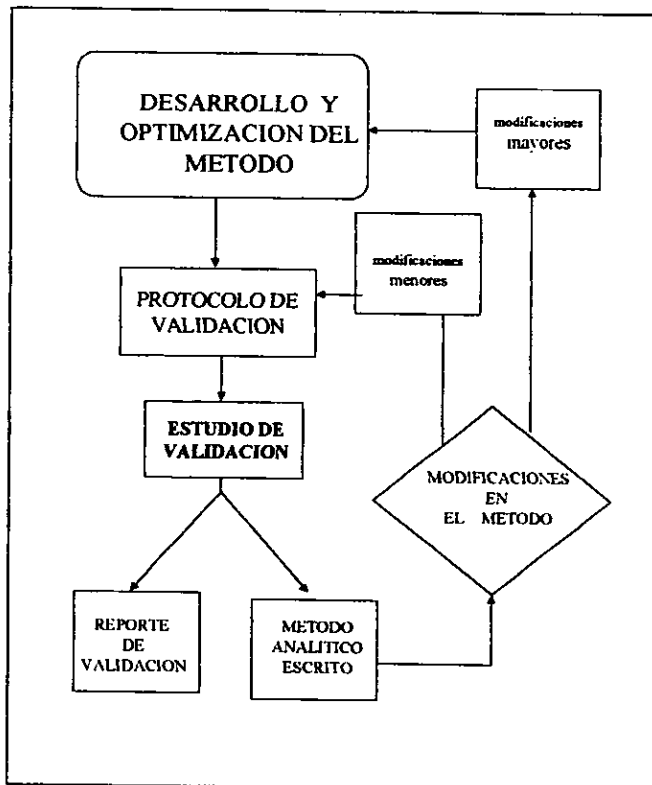


Figura 7. Ciclo de vida de un método analítico. Braggio S. et al. ¹

2.2.2.2.1 Proceso de Planeación

Como paso inicial, antes de la validación de un método se debe determinar el alcance del procedimiento analítico, ya que las pruebas requeridas están en función del tipo de método, la entidad química por analizar y la forma farmacéutica de dosificación. Se deben considerar aspectos tales como: presencia de productos de degradación o metabolitos, especificaciones de producto o concentraciones terapéuticas deseadas, impurezas, estabilidad de la muestra bajo las condiciones de almacenamiento previo al análisis y posible interferencia de componentes presentes. Con estas consideraciones se deben ir planeando: número de muestras, número de ensayos y réplicas, las variables externas controlables y no controlables que puedan influir durante el proceso, tiempo, reactivos y recursos necesarios para efectuar el proceso de validación.

2.2.2.2.2 Requerimientos de Validación

En base a los parámetros y necesidades definidas en la etapa anterior, se deben establecer los requerimientos de validación, es decir qué características de calidad deben ser evaluadas para poder demostrar confiabilidad del método (especificidad, linealidad, exactitud, precisión y robustez). En esta etapa, en función del ambiente regulatorio se establecen las especificaciones para cada una de las características de calidad, y como resultado se emite el protocolo de validación. El protocolo de validación es un documento en el que se incluye: la descripción detallada del método y de las etapas críticas, los requerimientos de validación y los límites para cada característica de calidad, el número de muestras y réplicas para cada ensayo, y los estimadores estadísticos con los que se determinará la validez de cada parámetro estudiado. Dicho documento debe estar debidamente revisado y autorizado.

2.2.2.2.3 Ensayo y Documentación de la Validación

En esta etapa se lleva a cabo experimentalmente el proceso de validación, se documentan los resultados analíticos obtenidos, los cálculos y criterios estadísticos aplicados y la comparación de los resultados obtenidos con respecto a los criterios de aceptación previamente establecidos. Se debe tomar en cuenta que es importante documentar todos los demás componentes que participan durante el proceso: calificación de equipo, documentación de materiales y reactivos, muestras probadas, calificación de analistas etc. Como resultado se obtiene el informe de validación, el cual además de documentar la validez del método, proporciona información del desempeño de la metodología durante el uso normal.

2.2.2.2.4 Cambios y Revalidación

Con el transcurso del tiempo, pueden presentarse -como necesidad operativa- cambios en la metodología analítica.

En esta etapa, dependiendo de los resultados del estudio de robustez, en caso de presentarse una situación de cambio, por ejemplo en caso de transferencia del método de un laboratorio a otro, se debe evaluar las características que deben revalidarse para asegurar la confiabilidad de los resultados proporcionados por el método aún en situaciones cambiantes. Ejemplo de estos cambios pueden ser:

Cambios en el instrumento de medición: Esta situación es típica cuando se desea utilizar un instrumento recién comprado. Los parámetros que deben validarse son: linealidad del sistema, precisión y límite de detección acorde al tipo de método analítico.

Cambios en el producto farmacéutico: Un cambio -por ejemplo- en la formulación, requerirá revalidar la especificidad y la precisión, siempre y cuando el cambio no sea demasiado grande, si el cambio es substancialmente mayor se debe iniciar nuevamente todo el proceso de validación, y en ocasiones deberá regresarse a la etapa de desarrollo y optimización del método

Modificaciones en el método: Los cambios en el método se deben evaluar de la misma forma que los cambios en el producto, si por ejemplo, se cambia el método de extracción, lo conveniente es revalidar la exactitud y precisión; si se cambian parámetros de operación instrumentales del método, siempre y cuando los cambios no sean mayores se puede evaluar únicamente precisión, pero si dichos cambios son grandes se debe validar nuevamente el método.

CAPITULO 3.

METODOLOGIA

3.1 Desarrollo del Algoritmo

La estrategia de validación elegida acorde a la cual se desarrollará el algoritmo, es la de aproximación al ciclo de vida propuesta por Hokanson^{15,16} et al.

3.1.1 Modelo del Ciclo de vida

En la siguiente figura se muestra un diagrama del proceso de validación dentro del contexto de la aproximación al ciclo de vida, dicho diagrama constituye la estrategia general que se utilizará para la elaboración del algoritmo, tomando en consideración las necesidades del usuario, y los objetivos del sistema.

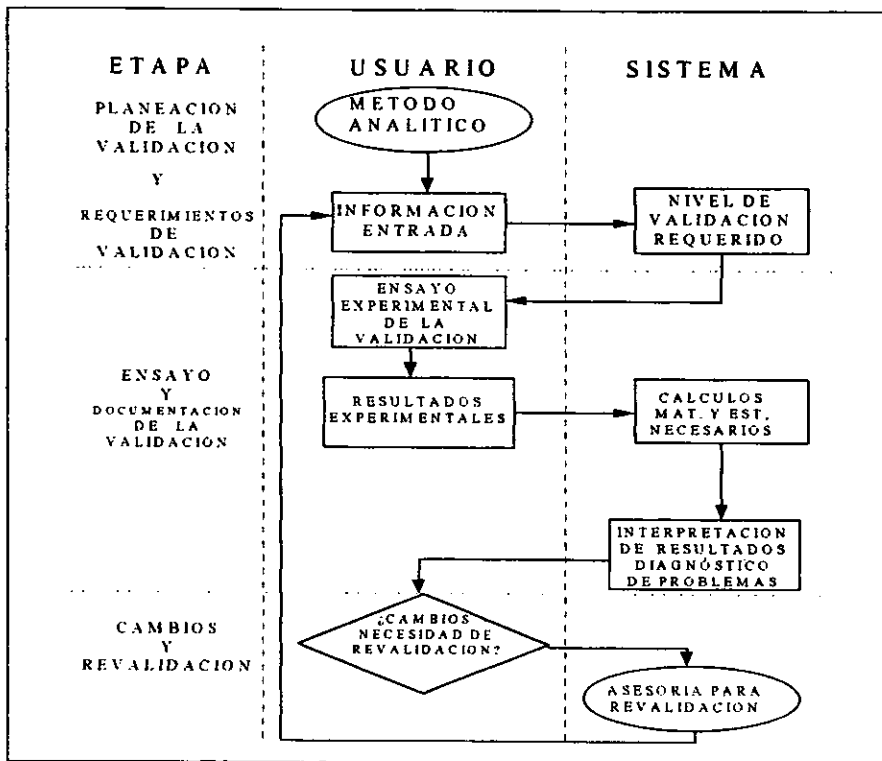


Figura 8. Diagrama de la estrategia general utilizada

3.1.1.1 Planeación de la validación

Para la realización del algoritmo durante la etapa de planeación, se clasificarán las diferentes metodologías analíticas, y sobre la base de dicha clasificación se asignarán requerimientos de validación para cada tipo de metodología tomando en consideración los diferentes organismos regulatorios:

Ambiente regulatorio:

Guías de validación nacionales

CNQFB⁵

Guías de validación internacionales:

ICH^{17,19}

FDA^{17,19}

CANADA¹⁸

ESTADOS UNIDOS USP³²

Para llevar a cabo la representación formal de la etapa de planeación de la validación se utilizarán diagramas de estados de transición (página 9) en los cuales se indicarán las pruebas y la secuencia de pruebas que se deben llevar a cabo para completar la validación de cada metodología. Adicionalmente se utilizará el diagrama de árbol de decisiones para poder seleccionar la categoría dentro de la clasificación en la cual se encuentra una metodología analítica específica.

3.1.1.2 Requerimientos de Validación

Una vez proporcionados los parámetros de calidad que deben evaluarse, el algoritmo debe incluir el mecanismo por el cual asesora acerca de los procedimientos, pruebas, documentación necesaria y el diseño experimental que debe realizarse en el laboratorio, para que una vez efectuado, se realicen los cálculos convenientes y a su vez se interpreten los resultados.

Para la realización del algoritmo en esta etapa, se llevarán a cabo la recopilación y selección de *definiciones*, *procedimiento experimental*, *cálculos*, *estimadores estadísticos* y *criterios de validez* que formarán parte de la futura base de conocimiento del sistema y que se utilizarán para evaluar cada una de las características de calidad. Dicha información se recopilará y seleccionará tomando en consideración las guías de validación actuales y los diferentes ambientes regulatorios ya mencionados.

Para la representación mediante diagramas de los requerimientos de validación se utilizarán diagramas de flujo secuencial para representar el flujo de información, procedimiento experimental, y decisiones para cada característica de calidad. La simbología básica que se utilizará para este tipo de diagramas es la siguiente:

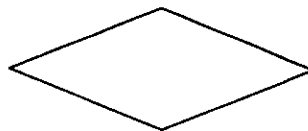
Inicio/fin



etapas del proceso



decisión



Dirección gráfica/secuencial de flujo



conectores



3.1.1.3 Ensayo y documentación de la validación

Durante esta etapa, se realizarán los diagramas de flujo que representan el algoritmo de operaciones matemáticas y estadísticas necesarias para llevar a cabo el procesamiento de datos, de cada una de las características de calidad. Los diagramas que se utilizarán para la representación de la etapa de ensayo y documentación de la validación son diagramas de flujo secuencial ya descritos.

3.1.1.4 Cambios y revalidación

Durante esta etapa, para la elaboración del algoritmo se clasificarán los diferentes tipos de cambios o modificaciones que se pueden llevar a cabo durante el ciclo de vida de una metodología. De acuerdo a dicha clasificación, a los organismos reguladores ya mencionados y el tipo de metodología analítica, se asignarán requerimientos de validación, y dicha información se incorporará al algoritmo. La representación mediante diagramas de esta etapa se llevará a cabo por medio de diagramas de estados de transición y diagramas de flujo secuencial, que se interconectarán con el diagrama principal.

3.2 Validación del algoritmo

Una vez que se haya desarrollado el algoritmo, se debe comprobar que sea capaz de resolver satisfactoriamente problemáticas específicas, para lo cual, se utilizarán 4 casos de estudio reportados, previamente resueltos en el laboratorio. Estos corresponden a :

- ensayos de identidad.
- determinación cuantitativa de principio activo.
- determinación cuantitativa de impurezas.
- ensayo de componentes en una matriz biológica.

Se llevará a cabo la solución de cada caso de estudio utilizando únicamente el algoritmo como herramienta, se analizarán los resultados independientes obtenidos por el algoritmo y además se compararán dichos resultados contra los informados del trabajo experimental. Para cada caso se evaluará:

- Nivel de validación requerido, (parámetros de validación seleccionados)

- Procedimiento experimental realizado para cada característica de calidad
- Cálculos realizados y estimadores estadísticos seleccionados.

3.2.1 Casos de estudio

3.2.1.1 Caso de estudio 1: Métodos analíticos utilizados para evaluación de identidad.

Método para identificación de naproxén sódico en tabletas por espectroscopía infrarroja. Tesis de Licenciatura de López Trujillo Jorge. UNAM²⁴

3.2.1.2 Caso de estudio 2: Métodos utilizados para cuantificación de principio activo o componente principal de la formulación

Método para cuantificación de sulfametazina sódica en materia prima por cromatografía de líquidos de alta resolución. Tesis de Licenciatura de Sánchez Aguilar Ma. Dolores. UNAM²⁸

3.2.1.3 Caso de estudio 3: Métodos para determinación cuantitativa de impurezas

Método para cuantificación de impurezas orgánicas volátiles en sulfametoxazol materia prima para uso farmacéutico. Tesis de Licenciatura de Castañeda R. José Luis. UNAM⁶

3.2.1.4 Caso de estudio 4: Métodos en los que está implicada una matriz biológica

Método para cuantificación de sulfametazina sódica en materia prima y plasma por cromatografía de líquidos de alta resolución. Tesis de Licenciatura de Trujeque García Ana Belem. UNAM³¹

CAPITULO 4.

RESULTADOS.

4.1 Desarrollo del Algoritmo

4.1.1 Modelo del Ciclo de Vida

4.1.1.1 Planeación de la Validación.

La clasificación de métodos analíticos propuesta en el presente trabajo, toma en consideración los diferentes tipos de métodos analíticos que se utilizan en la industria farmacéutica, y se encuentra sustentada en los criterios de México⁸, FDA¹¹, USP³² e ICH¹⁹. Diagrama DFPPAL (página 54).

- Ensayos utilizados para la evaluación de identidad
- Métodos utilizados para cuantificar principios activos o componentes principales en una formulación
- Métodos para llevar a cabo determinación cuantitativa de impurezas
- Pruebas límite de impurezas.
- Determinación de características de desempeño
- Métodos de análisis en los que se encuentra implicada una matriz biológica. (bioensayos)

La representación de la etapa de planeación mediante diagramas de flujo se llevó a cabo utilizando diagramas de estados de transición donde la información básica de entrada requerida al usuario es: conocer en cuál de las categorías anteriormente mencionadas se encuentra su método analítico, para que en función de su respuesta se proporcione el nivel de validación requerido, tal como puede observarse en el diagrama DFPPAL (página 56). Adicionalmente se incluyó el algoritmo que representa el proceso de ayuda para la identificación de la categoría en la que se encuentra una metodología específica, mediante diagramas de árbol de decisión. (Diagrama DFPPAL página 57)

Las características de calidad requeridas para cada uno de los métodos anteriormente clasificados son las siguientes, y constituye el nivel de validación requerido para cada metodología y está representado en el diagrama DFPPAL (página 54).

	Especificidad	Linealidad	Exactitud	Precisión	LDD*	LDC*	ROBUSTEZ
Ensayos utilizados para la evaluación de identidad	SI	NO	NO	NO	NO	NO	SI*
Métodos utilizados para cuantificación de principio activo.	SI	SI	SI	SI	NO	NO	SI*
Det. cuantitativa de impurezas	SI	SI	SI	SI	NO	SI	SI*
Prueba límite de impurezas	SI	NO	NO	SI	SI	NO	SI*
Determinación de carac. de desempeño	NO	NO	NO	SI	NO	NO	SI*
Métodos en los que se cuenta con una matriz biológica.	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI*
Especificaciones recomendadas	Ausencia de interferencia	$r^2 > 0.98$	recobro= 98-102%	DER<2.0 por ciento	3:1 señal de ruido	10:1 señal de ruido	inalteración de resultados en una variedad de condiciones.

4.1.1.2 Requerimientos de Validación

En esta etapa, el usuario debe llevar a cabo experimentalmente los ensayos de laboratorio adecuados para demostrar el cumplimiento con las especificaciones predeterminadas. Las definiciones, procedimiento experimental y tratamiento de datos seleccionados para cada una de las características de calidad es el siguiente, y está basado en los criterios de los organismos reguladores que a continuación se mencionan:

Ambiente regulatorio:

Guías de validación nacionales

CNQFB⁸

* LDD: límite de detección ;

* LDC: límite de cuantificación

* No es un requerimiento obligatorio.

Guías de validación internacionales:

ICH^{17,19}

FDA^{17, 19}

CANADA¹⁸

ESTADOS UNIDOS USP³²

4.1.1.2.1 ESPECIFICIDAD/SELECTIVIDAD*

Diagrama DFESP (página 66).

Definición. (ICH)¹⁹ : Especificidad es la capacidad de un método analítico para detectar de forma inequívoca e inconfundible el analito de interés, discriminándolo de otros componentes que pueden estar presentes en la matriz tales como excipientes, productos de degradación, precursores, metabolitos, etc

Procedimiento (ICH)¹⁹:

A) Pruebas de identificación: Se deben de correr cromatogramas , espectrogramas u obtener los registros de respuestas analíticas para el analito de interés (semejantes a las obtenidas contra un estándar) y respuesta negativa para muestras que no contengan el analito de interés y estén adicionadas de sustancias que pueden estar presentes en la matriz.

B) Ensayos de cuantificación e impurezas: Cuando las impurezas están disponibles en forma de estándares, se debe probar que la presencia de estas impurezas no afectan tanto la detección como el ensayo. Esto se logra, añadiendo dichas impurezas a muestras estándar, y llevando a cabo el método analítico de cuantificación en cuestión, comparando los resultados obtenidos de muestras añadidas contra los obtenidos únicamente para el estándar. Ahora bien, cuando las impurezas no están disponibles en forma de estándar se debe someter la muestra a condiciones de "stress" tales como luz, calor, humedad, o hidrólisis ácido base, dichas muestras se deben analizar tanto por el método en estudio como por otro método independiente farmacopeico o validado y ambos resultados se deben comparar.

* Para fines del presente trabajo, especificidad y selectividad se consideran sinónimos.

Cabe señalar que para métodos cromatográficos la especificidad se debe investigar, evaluando la resolución del pico de interés con sustancias que eluyan muy cercanamente a dicho pico.

4.1.1.2.2 LINEARIDAD

Diagrama DFLINEAR (página 67)

4.1.1.2.2.1 Linearidad del sistema.

Definición (CNQFB⁹): Es la capacidad del instrumento de medición de obtener respuestas analíticas directamente proporcionales a la concentración del analito

Procedimiento y cálculos (CNQFB⁹): Se determina, construyendo una curva de calibración (concentración vs respuesta medida) utilizando cuando menos 5 diluciones preparadas a partir de una misma solución patrón y haciendo análisis cuando menos por duplicado para cada dilución. El intervalo entre las concentraciones a analizar dependerá del propósito del método; y deberá estar incluida la concentración seleccionada como 100%. Evaluar por el parámetro de regresión r^2 .

4.1.1.2.2.2 Linearidad del método.

Diagrama DFLINEAR

Definición (ICH)¹⁹: La linealidad de un método analítico es su habilidad (dentro de un rango dado) para obtener respuestas analíticas directamente proporcionales a la concentración o cantidad de analito en la muestra.

Procedimiento y Cálculos¹¹: Se deben preparar una serie de muestras que contengan al menos 5 diferentes concentraciones de analito igualmente espaciados y considerando un rango de concentraciones desde 50 a 150 %. Usar al menos 3 réplicas por concentración. Utilizar la misma matriz en la cual las muestras están contenidas (placebos añadidos), calcular la media, desviación estándar y el coeficiente de variación para cada valor de concentración. Graficar la respuesta obtenida en función de la concentración, calcular la ecuación de regresión y el coeficiente de determinación. r^2 . La especificación recomendada es: $r^2 \geq 0.98$

4.1.1.2.3 EXACTITUD DEL METODO

Diagrama DFEXAC (página 69)

Definición (ICH)¹⁸: La exactitud de un método analítico expresa la concordancia entre los valores encontrados para una muestra y la concentración real de la muestra.

Procedimiento y Cálculos¹¹: Preparar una serie de muestras con al menos 3 puntos de concentración desde 50 % hasta 150% de la concentración especificada en el rango de trabajo. Usar al menos 3 réplicas por concentración. Utilizar la matriz en la cual está contenida la muestra (placebos añadidos). Registrar para cada muestra el valor teórico, el resultado analítico y el porcentaje recuperado en relación a la cantidad añadida conocida. Calcular la media, la desviación estándar y la desviación estándar relativa. El porcentaje de recuperación se debe encontrar entre 98 y 102%

4.1.1.2.4 LIMITE DE DETECCION

Diagrama DFLOD (página 70)

Definición (ICH)¹⁸: Es la mínima concentración de una sustancia en una muestra que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, bajo las condiciones de operación establecidas.

Procedimiento (ICH)¹⁹:

A) Basado en Inspección visual: La evaluación visual puede ser usada para métodos no instrumentales. Se preparan muestras de concentraciones conocidas y se van diluyendo, y visualmente se establece la concentración mínima a la cual el analito puede ser confiablemente detectado.

CRITERIO. Se considera como límite de detección a la concentración mínima que visualmente puede ser detectada.

B) Basado en la señal de ruido: Este método se puede aplicar únicamente a aquellos procedimientos analíticos que exhiben línea base de ruido. Se deben comparar muestras de concentraciones conocidas muy bajas con la señal de muestras blanco. El límite de detección aceptado es una relación 3:1 señal de ruido.

CRITERIO: Se considera como límite de detección una relación 3:1 señal de muestra a señal de ruido.

c) Basado en la desviación estándar de la respuesta y la pendiente: El límite de detección puede ser expresado como:

$$LD = 3.3 (S.) / M$$

donde S. es la desviación estándar de la respuesta
y M es la pendiente de la curva de calibración

El valor de S puede ser evaluado en dos formas:

c.1) Basado en la desviación estándar del blanco: Calcular la desviación estándar de respuesta de un número apropiado de muestras blanco.

c.2) Basado en la desviación estándar de los interceptos calculados en un número apropiado de curvas de calibración.

4.1.1.2.5 LIMITE DE CUANTIFICACIÓN

Diagrama DFLOQ (página 71)

Definición (ICH) ¹⁸: Es la menor concentración de una sustancia en una muestra que puede ser determinada con precisión y exactitud aceptables bajo las condiciones de operación establecidas.

Procedimiento (ICH) ¹⁸

A) Basado en Inspección visual: La evaluación visual puede ser usada para métodos no instrumentales. Se preparan muestras de concentraciones conocidas y se van diluyendo, y visualmente se establece la concentración mínima a la cual el analito puede ser cuantificado con exactitud y precisión

b) Basado en la señal de ruido: Este método es aplicable únicamente en aquellos procedimientos analíticos que exhiben línea base de ruido. Se deben comparar muestras de concentraciones conocidas muy bajas con la señal de muestras blanco. El límite de cuantificación aceptado es una relación 10:1 señal de ruido.

CRITERIO: Se considera como limite de cuantificación una relación 10:1 señal de muestra : señal de ruido.

c)Basado en la desviación estándar de la respuesta y la pendiente: El límite de cuantificación puede ser expresado como:

$$LD= 10 (S)/M$$

donde S es la desviación estándar de la respuesta

y M es la pendiente de la curva de calibración

El valor de S puede ser evaluado en dos formas:

c.1) Basado en la desviación estándar del blanco: Calcular la desviación estándar de respuesta de un número apropiado de muestras blanco.

c.2) Basado en la desviación estándar de los interceptos calculados en un número apropiado de curvas de calibración.

4.1.1.2.6 PRECISION DEL SISTEMA

Diagrama DFPREC (página 72)

Definición (ICH)¹⁸ : Expresa la concordancia de las respuestas obtenidas de dos o más muestras que contienen solamente el analito de interés obtenidas bajo condiciones idénticas usando el mismo método analítico.

Procedimiento y Cálculos²⁰ : Se deben analizar 6 réplicas de una solución estándar que contiene la concentración al 100% especificado. Calcular la media, la desviación estándar y el coeficiente de variación. La especificación recomendada es DER $\leq 2.0\%$

4.1.1.2.7 PRECISION DEL METODO (Evaluada como Repetibilidad)

Diagrama DFPREC (página 73)

Definición (ICH)¹⁸ : Expresa la concordancia de las respuestas obtenidas de dos o más muestras obtenidas bajo condiciones idénticas usando el mismo método analítico.

Procedimiento y Cálculos²⁰ : Se debe preparar una muestra que contenga el analito de interés (estándar) adicionado a la matriz en la cual se encuentra la muestra. El tamaño de muestra preparada debe corresponder a 20 veces la cantidad necesaria para un ensayo. Utilizar el valor de concentración al 100 % especificado y analizar 6 réplicas

acorde al método en cuestión. Calcular la media, la desviación estándar y el coeficiente de variación. La especificación recomendada es: $DER \leq 2.0 \%$

4.1.1.2.8 PRECISION DEL METODO (Evaluada como Reproducibilidad)

Diagrama DFPREC (página 73)

Definición (ICH)¹⁸ : La reproducibilidad, también conocida como precisión intermedia, expresa variación dentro de un mismo laboratorio: diferentes días, diferentes analistas y diferentes experimentos.

Procedimiento (CNQFB)⁸ : Generalmente se valida el hecho de que no exista diferencia entre analistas y entre días de realización del análisis, para lo cual dos analistas en dos días diferentes analizan por triplicado placebos cargados con el analito de interés en una concentración equivalente al 100%.

Cálculos (CNQFB)⁸ Se debe calcular el coeficiente de variación total, no obstante, para averiguar si existe influencia de factores antes mencionados (analista, día, laboratorio, etc), se debe realizar un análisis de varianza, y de esta forma establecer si existe o no influencia de tales factores.

Diseño Experimental

Factores :

Influencia entre analista (ANALISTA 1 Y ANALISTA 2)

Influencia entre días (DÍA 1 Y DÍA 2)

d= respuesta analítica expresada en la tabla como d_(analista,día,réplica)

	analista 1	analista 2
día 1	d1,1,1	d2,1,1
	d1,1,2	d2,1,2
	d1,1,3	d2,1,3
día 2	d1,2,1	d2,2,1
	d1,2,2	d2,2,2
	d1,2,3	d2,2,3

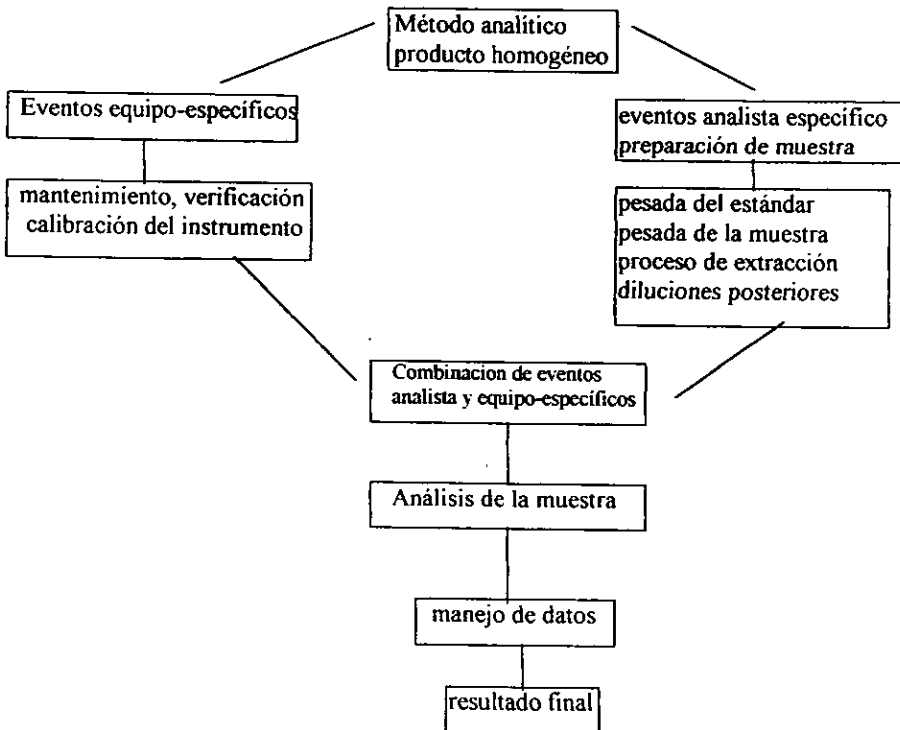
4.1.1.2.9 ROBUSTEZ

Diagrama DFROBUS (página 75)

DEFINICION (ICH)¹⁸.- La robustez de un método analítico es una medida de su capacidad para mantenerse inalterado por pequeñas pero deliberadas variaciones en los parámetros del método y provee de información más amplia de confiabilidad bajo

condiciones normales de operación. Cabe mencionar que este parámetro anteriormente era conocido con el nombre de tolerancia del método y que hasta el momento, en ningún documento regulatorio nacional o internacional es solicitado con carácter de obligatorio, sin embargo, el contar con dichos estudios es de gran utilidad pues proveen de una guía eficaz sobre la necesidad de revalidación en condiciones cambiantes, por ejemplo durante la transferencia de un método entre laboratorios.

Procedimiento: Para realizar estudios de robustez, se deben identificar las variables críticas del proceso de análisis, para lo cual, el procedimiento debe ser dividido en operaciones unitarias tal como se muestra en la siguiente figura¹⁶:



Es de gran importancia, el hecho de que una vez construido el diagrama se evalúen variaciones potenciales en cada una de las operaciones indicadas por ejemplo: la cantidad de estándar y muestra pesadas, los volúmenes usados, el tiempo y forma de agitación, el tiempo efectivo de extracción, los modelos y fabricantes de los equipos, los efectos del envejecimiento de la muestra, la longitud de onda o flujos utilizados en el

análisis, los valores de pH o fuerza iónica, la polaridad de fase móvil, variaciones entre analistas, variaciones entre días o variaciones entre laboratorios.

Una de las formas más eficaces para la evaluación de la robustez de un método analítico es aplicando diseño de experimentos. La metodología seleccionada en el presente trabajo consistió en un diseño matricial tipo Plackette-Burman⁸, cuyas aplicaciones en validación de métodos analíticos han sido previamente reportadas³⁰.

El diseño experimental aplicado fue el siguiente:

Número de factores: desde tres hasta siete, (para un experimento con ocho corridas)

Niveles: (+) y (-): rango de valores asignados a los factores

(+): valor de la variable en condiciones normales de experimentación

(-): valor de la variable en situaciones de cambio

	A	B	C	D	E	F	G	RESPUESTA
1	+	+	+	-	+	-	-	Y1
2	-	+	+	+	-	+	-	Y2
3	-	-	+	+	+	-	+	Y3
4	+	-	-	+	+	+	-	Y4
5	-	+	-	-	+	+	+	Y5
6	+	-	+	-	-	+	+	Y6
7	+	+	-	+	-	-	+	Y7
8	-	-	-	-	-	-	-	Y8

TABLA # Diseño matricial Plackette-Burman³⁰

Es necesario tomar en cuenta que:

- los experimentos deben efectuarse en orden aleatorio
- es recomendable realizar réplicas para cada experimento
- se deben de llevar a cabo todos los experimentos

Para calcular la magnitud del efecto de cada variable sobre la respuesta analítica, se deben multiplicar los valores de la columna de respuestas por cada uno de los signos en

* El diseño Matricial Plackette-Burman, da como resultado únicamente la evaluación de efectos principales de los factores sobre la variable de respuesta, por lo cual es aplicable a estudios de robustez, permitiendo estudiar con pocos experimentos un gran número de factores, sin tomar en cuenta las interacciones.

las columnas. Posteriormente debe calcularse la suma de los valores referidos por columna, y el resultado de dicha suma dividido entre cuatro será igual a la magnitud del efecto de cada factor.

Una vez que se ha calculado la magnitud del efecto de cada factor, se debe averiguar si dicho efecto es significativo. Lo anterior se lleva a cabo por medio de un análisis de varianza, evaluando a un nivel de confianza apropiado, la hipótesis nula que señala no haber diferencia significativa en la variable de respuesta por el cambio de nivel en un factor, contra la hipótesis alterna que establece diferencia significativa con respecto al cambio de nivel en un factor.

Si al llevar a cabo el análisis de varianza, se acepta la hipótesis que establece diferencia no significativa en la respuesta por el cambio de nivel en un factor, se dice que el método es robusto para dicho factor, delimitado por ambos niveles (+ y -). El hecho de que el método no resulte robusto para el cambio en un determinado factor, indica que al ocurrir dichas situaciones cambiantes es necesario modificar condiciones del método y revalidar.

4.1.1.3 ENSAYO Y DOCUMENTACION DE LA VALIDACION.

Para llevar a cabo el proceso de validación y tratamiento de datos proporcionados por el usuario, se elaboraron diagramas de flujo a tres niveles:

1er nivel: Diagrama de flujo principal (Diagrama DFPPAL página 53), el cual indica el mecanismo general de validación de métodos analíticos y relaciona todas las actividades de validación en forma general.

2do nivel: Diagramas de flujo de información para cada característica de calidad. Dichos diagramas indican el mecanismo general y flujo de información para cada característica de calidad: especificidad, linealidad, exactitud, precisión y robustez.

3er nivel: Diagramas de flujo de cálculo que representan en forma específica, el algoritmo matemático y estadístico, según corresponda para cada una de las características de calidad.

Cabe mencionar, que tanto los diagramas de cálculos como los de proceso de información se encuentran relacionados entre sí por medio del diagrama de flujo principal, en el cual es representado de forma general el proceso de validación. Sobre la estructura del diagrama principal se generan los diagramas particulares para cada característica de

calidad, los que a su vez constituyen la base de construcción de los diagramas de cálculos.

En la siguiente tabla se muestra para cada parámetro de calidad los cálculos que realiza, y su respectiva referencia diagramática:

<i>Característica de Calidad</i>	<i>Cálculo matemático de estimadores estadísticos</i>	<i>DIAGRAMA (referencia)</i>
Linealidad	Media, desviación estándar, regresión lineal, pendiente, intercepto, coeficiente de correlación y coeficiente de determinación	DCALCLIN (página 76)
Exactitud	% de recobro, Media, desviación estándar, coeficiente de variación, datos de regresión: intercepto, pendiente, coeficiente de correlación	DCALCEXA (página 81)
Precisión	Media, desviación estándar, coeficiente de variación, análisis de varianza: sumas de cuadrados, valores de F de Fischer.	DCALCREP Y DCALCREPR (página 84).
Límite de Detección	Media, desviación estándar, cálculos de regresión: intercepto	DCALCLOD (página 90)
Límite de Cuantificación	Media, desviación estándar, cálculos de regresión: intercepto.	DCALCLOQ (página 93)
Robustez	Resolución de Matriz tipo Plackette-Burman, para cálculo de efectos, sumas de cuadrados, valores F calculados.	DCALCROB (página 96)

4.1.1.4 CAMBIOS Y REVALIDACION

La clasificación de cambios probables durante el ciclo de vida de una metodología y los requerimientos de validación acorde a cada clase de cambio quedan como sigue: (Diagrama DFREV página 59)

- Cambios en la Instrumentación: Se deben realizar pruebas de especificidad, linealidad del sistema, precisión del sistema, límite de detección y límite de cuantificación.
- Cambios en el producto: sea por modificación de la formulación o por cambios provocados por el tiempo (estudios de estabilidad): Se deben realizar pruebas de especificidad, exactitud y precisión.
- Modificaciones en el método: Se deben realizar pruebas de especificidad, exactitud y precisión.

Cambio de analistas: Se deben realizar pruebas de precisión.

La representación de esta sección en diagramas de flujo se llevó a cabo por una combinación de diagramas de estados de transición y diagramas de flujo secuencial, tal como puede observarse en los diagramas DFREV (páginas 59-65). Dichos diagramas se encuentran interconectados con el diagrama principal.

4.2 VALIDACION DEL ALGORITMO

Los resultados de la validación para cada caso de estudio se encuentran en el anexo 2

CAPITULO 5

ANALISIS DE RESULTADOS

5.1 Desarrollo del algoritmo

5.1.1 Estrategia de ciclo de vida

5.1.1.1 Planeación de la validación

Como se puede observar en el capítulo de resultados, la clasificación propuesta considera las posibles pruebas de evaluación que se aplican a medicamentos y difiere respecto a las clasificaciones publicadas ya que se considera un tipo de métodos que hasta ahora en aspectos de validación se han tratado de forma aparte: los métodos de evaluación en los cuales está implicada una matriz biológica. Dicha categoría incluye los métodos utilizados en estudios clínicos (biodisponibilidad, bioequivalencia) y también la evaluación en drogas crudas y productos naturales. Lo anterior, junto con la posibilidad de que los usuarios elijan en forma personalizada los requerimientos de validación se incorporó al algoritmo con la finalidad de que la aplicación futura se oriente a satisfacer las expectativas de un número mayor de usuarios.

La utilización relacionada y simultánea de diferentes tipos de diagramas de flujo para esta etapa, (diagrama de estados de transición, y árbol de decisiones) facilitó la representación del conocimiento, ya que durante el proceso de planeación las inferencias lógicas no pueden relacionarse a un algoritmo matemático, y la utilización de diagramas de flujo secuencial, o bien el uso de cada uno de los diagramas mencionados aisladamente limitaría en forma importante no sólo la representación, sino también el proceso futuro de programación, ya que en vez de llegar a un único diagrama integrado, se llegaría a diagramas aislados de cada parte del algoritmo.

5.1.1.2 Requerimientos de validación

Las definiciones, procedimiento experimental, y cálculos propuestos fueron tomados de varias fuentes, ya que para validación de métodos analíticos existen diferentes organismos reguladores con diferentes especificaciones, y el hecho de

introducir criterios de una sola fuente particularizaría, y por lo tanto limitaría la aplicación a un ambiente regulador determinado. No obstante que las diferencias entre los organismos reguladores son pequeñas y principalmente de carácter semántico, la selección tomó en consideración criterios generales, actualizados y aceptados por la mayoría de los ambientes. De tal forma que se seleccionaron definiciones y terminología actualizadas y conformes con los criterios generales de validación; los procedimientos experimentales fueron seleccionados acorde con las definiciones, es decir reflejan los atributos solicitados en la definición y son los más actualizados hasta la fecha; por lo que respecta a los criterios de validez se seleccionaron los más actualizados hasta el momento, y con los cuales estuvieran de acuerdo la mayoría de organismos reguladores.

5.1.1.3 Ensayo y documentación de la validación

La utilización de diagramas de flujo secuencial para llevar a cabo los diagramas de cálculos aplicables a esta etapa facilitaron la representación del conocimiento, en virtud de que los algoritmos matemáticos cuentan con una serie de ciclos y condiciones, que para representarse de forma correcta, requieren de seguimiento paso a paso, además de que este tipo de diagrama es de uso generalizado, con una simbología bien conocida y estandarizada, que permite identificar rápidamente las entradas, los procesos, las decisiones y las salidas de información.

Cabe mencionar que dentro del proceso de datos se incluyó la aplicación del diseño de experimentos para la evaluación de la robustez, la cual consiste en la aplicación de un diseño tipo Plackette-Burman para averiguar la influencia de factores en condiciones de cambio sobre los resultados analíticos. La inclusión de una herramienta para evaluar robustez es de gran importancia en virtud de que los resultados de esta evaluación constituyen la pauta para la revalidación, además de que se ha convertido en un requerimiento analítico recomendado en muchos ambientes regulatorios, y no hay mucha información disponible acerca de cómo deben conducirse dichos estudios y cómo interpretar los resultados obtenidos.

Los resultados del procesamiento de datos por el algoritmo, así como de la decisión sobre validez se discuten en la sección de validación del algoritmo (5.2).

5.1.1.4 Cambios y revalidación

La aplicación de diagramas de flujo combinado para esta sección (diagramas de transición y diagramas de flujo secuencial) facilitaron la representación formal del conocimiento, ya que para este tipo de algoritmos, se debe considerar que por un lado la solución no es única y por el otro, dicha solución no puede ser representada por un algoritmo matemático, además de que la forma de representación permite que en un mismo diagrama se pueda observar gráficamente el manejo de la base de conocimientos en un momento determinado.

El hecho de que el algoritmo incluya el proceso de revalidación es de gran importancia, ya que durante la vida de una metodología suceden situaciones de cambio para las cuales un método validado no es robusto, y el poder contar con asesoría de cuándo y cómo llevar a cabo la revalidación resulta de gran ayuda, sobre todo porque no existe mucha información regulatoria publicada en la cual se indique bajo qué circunstancias llevar a cabo el proceso de revalidación y cuáles son los parámetros que deben evaluarse. Cabe mencionar que esta sección del algoritmo únicamente fue revisada por el equipo experto, y no se incluyó dentro de la validación del algoritmo, pues para esto es necesario contar con resultados experimentales de un proceso de revalidación.

5.2 Validación del algoritmo.

Después de haber llevado a cabo la solución de cuatro casos de estudio utilizando como herramienta únicamente el algoritmo, para efectos de análisis compararemos las soluciones planteadas por el algoritmo y los resultados prácticos. Para cada caso se evaluará: nivel de validación requerido, procedimiento experimental, estimadores estadísticos seleccionados y resultados numéricos. Los resultados de la comparación entre las respuestas proporcionadas por el algoritmo y las utilizadas en cada caso de estudio se muestran en el anexo 3 (página 163).

5.2.1.1 Caso de estudio 1: Métodos para evaluación de identidad (página 163)

Método para identificación de Naproxén sódico en tabletas por espectroscopia infrarroja ²⁴

Como puede observarse, para este tipo de metodología el nivel de validación seleccionado en el caso de estudio y el recomendado por el algoritmo es esencialmente el mismo, a excepción del parámetro robustez, ello se debe a que los estudios de robustez son un parámetro recomendado recientemente, y en México no existe aún alguna norma, lineamiento o guía de validación en la que dicho requerimiento sea necesario para demostrar validez de una metodología.

En cuanto al procedimiento experimental y a la evaluación de la prueba de especificidad, el algoritmo no incluye dentro de su mecanismo un medio para demostrar validez de este parámetro de calidad en virtud de que a este tipo de pruebas no se les aplica convencionalmente algún análisis estadístico o un factor numérico con el cual se pueda constatar ausencia de interferencia; por lo tanto, no se puede decidir acerca de la validez, sin embargo el algoritmo podría utilizar respuestas por atributos o respuestas lógicas del tipo si/no, de lo contrario la aplicación del futuro sistema para este tipo de determinaciones quedaría limitada a la asesoría que proporciona al usuario. No obstante, el algoritmo indica en forma correcta y concordante con el caso de estudio la documentación que debe reunirse para validar dicha característica de calidad..

5.2.1.2 Caso de estudio 2: Métodos para cuantificación de principio activo (página 165)

Método para cuantificación de sulfametazina sódica en materia prima por cromatografía de líquidos de alta resolución. ²⁵

Como puede observarse en el anexo 3, caso de estudio 2, para este tipo de metodología se observa que los requerimientos de validación recomendados por el algoritmo y los seleccionados en el caso de estudio, son los mismos a excepción

nuevamente de la evaluación de robustez; a este respecto, debe tomarse en cuenta que la incorporación de este parámetro a los requerimientos de calidad para una metodología analítica es relativamente reciente y el hecho de que el algoritmo lo incorpore dentro de su mecanismo de solución implica que el futuro sistema no permitirá pasar por alto el estudio de dicho parámetro.

En cuanto al procedimiento experimental recomendado por el algoritmo para cada una de las pruebas y el llevado a cabo en el caso de estudio, se observa que es el mismo, y el algoritmo recomienda de forma correcta el número mínimo de muestras, réplicas y condiciones de ensayo que deben efectuarse para evaluar cada caso.

Respecto a los resultados experimentales obtenidos, al comparar se observa que tanto en el caso de estudio como utilizando el algoritmo se llegó a la misma solución matemática para cada parámetro, lo cual indica que el algoritmo resuelve de forma correcta los cálculos planeados. En el caso de especificidad, cabe señalar la misma observación que para el caso de estudio anterior, ya que la aplicación de este parámetro puede resultar limitada. Respecto al estudio de robustez, el diagrama de flujo matemático no pudo ser evaluado, pues no se cuenta con determinaciones experimentales que proporcionen los datos solicitados por el algoritmo. Finalmente la decisión acerca de la validez del método coincide con el caso de estudio, de tal forma que el algoritmo llega a las mismas conclusiones que las reportadas.

5.2.1.3 Caso de estudio 3: Métodos para determinación cuantitativa de impurezas (página 170)

Método para cuantificación de impurezas orgánicas volátiles en sulfametoxazol materia prima para uso farmacéutico, por cromatografía de gases.⁶

Como puede observarse en el anexo 3, caso de estudio 3, los parámetros de calidad seleccionados por el algoritmo para el caso de estudio difieren de los seleccionados en el laboratorio en lo siguiente: El algoritmo indica que se debe evaluar especificidad, linealidad, exactitud, precisión, límite de cuantificación y robustez, en el caso práctico no se evaluarán especificidad, límite de cuantificación y robustez.

Tomando en consideración que el método es utilizado para cuantificación de impurezas, es importante demostrar que ninguno de los componentes de la muestra interfiere con la determinación cuantitativa de dichas impurezas por lo que debe evaluarse especificidad; para el caso de límite de cuantificación, al ser una prueba que cuantifica analitos cuya concentración estimada es generalmente muy baja, desconocida y cuya proporción puede ser de diversa magnitud, es fundamental demostrar y documentar hasta qué límite de concentraciones el método es capaz de cuantificar una impureza con exactitud y precisión. En estos casos, como puede observarse el algoritmo no permite realizar omisiones en cuanto a los parámetros de calidad necesarios que deben evaluarse.

Para el caso de la prueba robustez, en el laboratorio se realizó una prueba conocida como tolerancia del método, utilizando como factor la variación en la cantidad de uno de los reactivos que indica e procedimiento. Para este caso, el algoritmo recomienda el ensayo de robustez, dando la oportunidad de evaluar la influencia de un número mayor de factores y proporcionando resultados acerca del desempeño del método en situaciones cambiantes.

En cuanto a las especificaciones seleccionadas en el caso de estudio, para la prueba de exactitud se definió un rango de 80-120% como porcentaje de recuperación, el recomendado por el algoritmo es 98-102%. En este caso, el algoritmo no permite tomar valores incorrectos de especificaciones y aunque tiene la posibilidad de modificar especificaciones y predeterminar parámetros de trabajo, como consideración para la elaboración del sistema, debe tomarse en cuenta el requerir de alguna justificación que se almacene para que se documente la razón y naturaleza del cambio efectuado.

Respecto al procedimiento experimental el caso reporta para la prueba de precisión (repetibilidad) el uso de 4 réplicas, el algoritmo indica que al menos deben correrse 6 réplicas para que el cálculo de variación sea significativo, posteriormente al llevar a cabo los cálculos, el algoritmo conduce a una salida ya que incluye un mecanismo por el cual no se procesan datos que no cumplan con los requerimientos mínimos indicados. La herramienta desarrollada indica correctamente el procedimiento

experimental que debe llevarse a cabo y no permite que se procesen datos incorrectos o que no cumplen con los requerimientos para poder tomar una decisión.

Finalmente respecto a los resultados numéricos obtenidos por el algoritmo se observa que coinciden a los calculados por el caso de estudio, sin embargo hace falta información para poder decidir acerca de la validez del método.

5.2.1.4 Caso de estudio 4: Métodos de ensayo en los que está implicada una matriz biológica (página 176)

Método para cuantificación de sulfametazina sódica en materia prima y plasma por cromatografía de líquidos de alta resolución.³¹

El nivel de validación recomendado por el algoritmo es esencialmente el mismo que se ejecutó en el caso de estudio a excepción –como en los casos anteriores- del parámetro robustez. De igual forma, dicha diferencia es lógica pues el concepto de robustez es relativamente nuevo, y en consecuencia, resulta ser importante el desarrollo de herramientas que al aplicarlas no permitan omisiones durante el proceso de validación.

Con respecto al procedimiento experimental seguido en el caso de estudio, se observa que es compatible con el procedimiento recomendado por el algoritmo a excepción del límite de detección y de cuantificación. En el caso de estudio, dichos parámetros se calcularon basándose en los límites de confianza (superior e inferior) calculados para la curva de calibración y el propuesto por el algoritmo utiliza como datos la desviación estándar de las lecturas de un número determinado de muestras blanco y la pendiente de la curva de calibración, ambos cálculos son apropiados. Sin embargo, el algoritmo utiliza el procedimiento y criterio más actualizados, y considera la variación de respuesta obtenida al analizar muestras blancos y la pendiente de la curva de calibración, que es medida de la sensibilidad del método.

Los resultados numéricos calculados por el algoritmo coinciden a los obtenidos para el caso de estudio. Únicamente no se evaluaron el límite de detección y cuantificación pues no se cuenta con los resultados solicitados por el algoritmo.

Por último vale la pena reflexionar acerca de la aplicación de los sistemas expertos en el laboratorio analítico. En realidad no se pretende bajo ninguna circunstancia que un sistema computacional reemplace la labor de un ser humano experto en el área; el objetivo principal de la aplicación de sistemas expertos en el laboratorio radica en agilizar aquellas labores que se llevan acorde a la experiencia, ayudando a que personal que no es altamente especializado pueda ejecutar eficazmente este tipo de actividades optimizando los recursos disponibles.

CAPITULO 6

CONCLUSIONES

El algoritmo desarrollado constituye la base específica sobre la cual se sustenta el proceso de arquitectura del Sistema Experto para validación de métodos analíticos, la elaboración y representación del conocimiento mediante diagramas de flujo, forman parte de la etapa inicial de desarrollo y con ésto se logró obtener una herramienta eficaz para la etapa de programación.

Dentro de este contexto, la estrategia seleccionada –Aproximación al ciclo de vida- resultó ser apropiada, pues constituyó la base de construcción específica sobre la cual se diseñó el algoritmo, toda vez que dicha estrategia orienta a la validación de métodos analíticos como un proceso dinámico dirigido a los requerimientos del usuario. Además, al aplicar cada una de las etapas: Planeación de la Validación, Requerimientos de Validación, Ensayo y Documentación de la Validación y Cambios y Revalidación, se van resolviendo de forma sistemática cada una de las cuestiones planteadas como necesidades de los futuros usuarios.

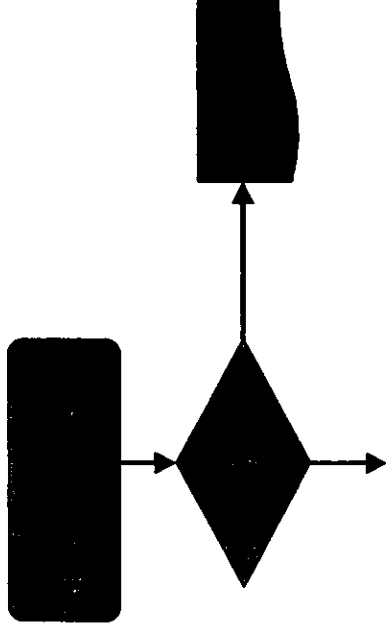
El uso de árbol de decisiones, diagramas secuenciales y diagramas de estados de transición, en combinación, resultó apropiado, ya que de forma integral en un solo diagrama general se representan diferentes tipos de algoritmos.

El proceso de validación del algoritmo sirvió para localizar secciones del algoritmo que conviene optimizar como es el caso del ensayo de especificidad.

Al aplicar el algoritmo a casos de estudio, se constató que las soluciones proporcionadas por la herramienta desarrollada coinciden en la mayor parte de los casos con la solución obtenida en el laboratorio y en los casos donde no hay concordancia, el algoritmo proporciona una solución mejor, que evita cometer errores u omisiones que puedan llevar a un proceso de validación incorrecto.

Anexo 1.

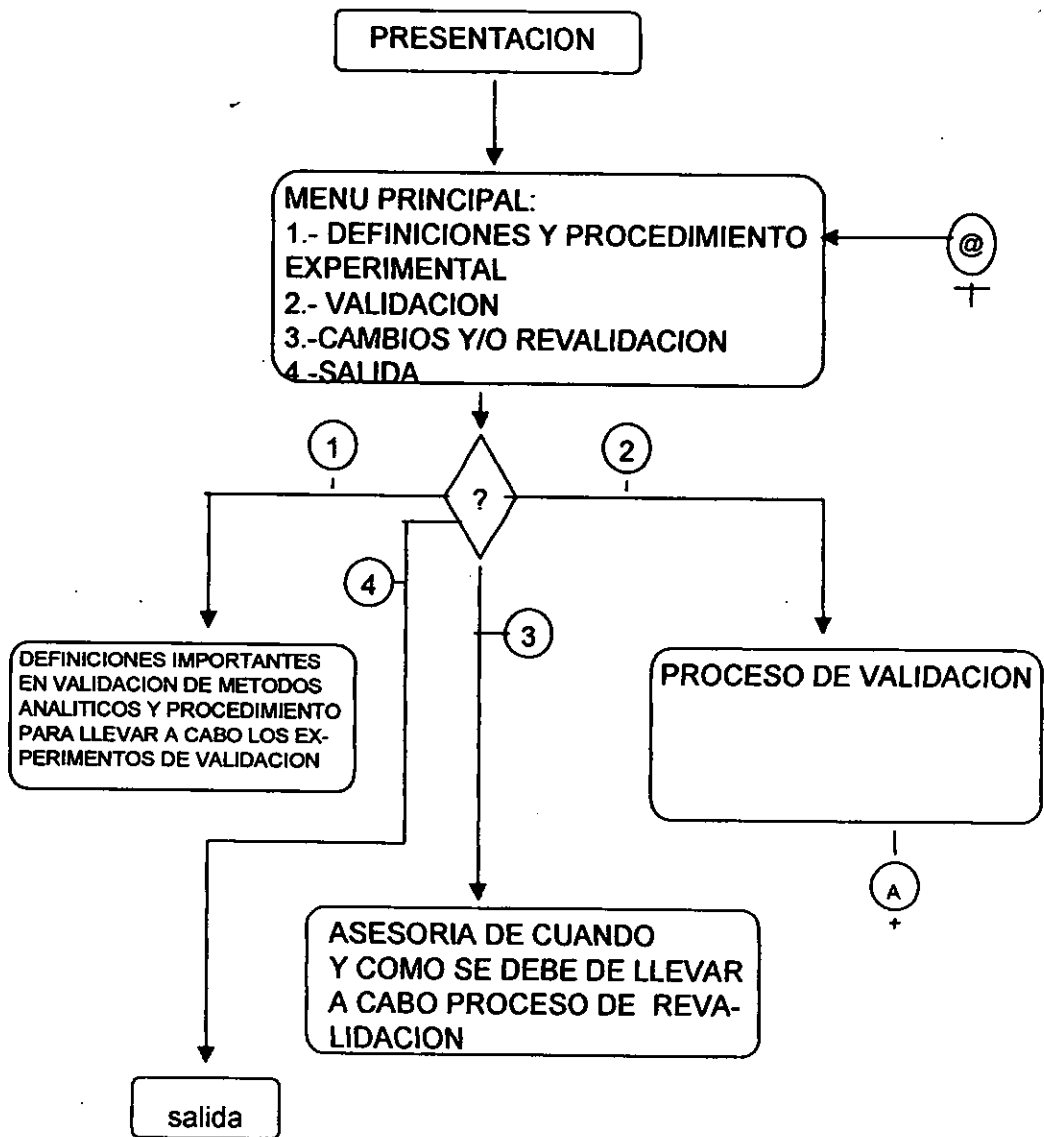
Diagramas de flujo



Guía para leer e interpretar los diagramas de flujo.

Diagrama de flujo (nombre)	Descripción	Páginas
DFPPAL	Diagrama de flujo principal	53-58
DFREV	Diagrama de flujo para proceso de revalidación	59-65
DFESP	Diagrama de flujo para prueba de especificidad	66
DFLINEAR	Diagrama de flujo para prueba de linealidad	67-68
DFEXAC	Diagrama de flujo para exactitud	69
DFLOD	Diagrama de flujo para prueba de límite de detección	70
DFLOQ	Diagrama de flujo para prueba de límite de cuantificación	71
DFPREC	Diagrama de flujo para prueba de precisión	72-74
DFROB	Diagrama de flujo para prueba de robustez	75
DCALCLIN	Diagrama de cálculos para resultados de linealidad	76-80
DCALCEXA	Diagrama de cálculos para resultados de exactitud	81-83
DCALCREP	Diagrama de cálculos para resultados de repetibilidad	84-85
DCALCREPR	Diagrama de cálculos para resultados de reproducibilidad	86-89

Diagrama de flujo (nombre)	Descripción	Páginas
DCALCLOD	Diagrama de cálculos para resultados de límite de detección	90-92
DCALCLOQ	Diagrama de cálculos para resultados de límite de cuantificación	93-95
DCALCROB	Diagrama de cálculos para resultados de robustez	96-100



(A)
+

VALIDACION



¿QUE TIPO DE METODO ANALITICO DESEA VALIDAR?

- I. METODOS UTILIZADOS PARA EVALUAR IDENTIDAD
- II. METODOS PARA CUANTIFICAR P.A. O COMPONENTES PRINCIPALES
- III. DETERMINACION CUANTITATIVA DE IMPUREZAS
- IV. PRUEBA LIMITE DE IMPUREZAS
- V. DETERMINACION DE CARACTERISTICAS DE DESEMPEÑO: VISCOSIDAD, pH, DESINTEGRACION, DISOLUCION.
- VI. METODOS UTILIZADOS PARA ANALISIS DE MUESTRAS CONTENIDAS EN MATRICES BIOLÓGICAS
- VII. PERSONALIZAR REQUERIMIENTOS DE VALIDACION
- VIII. AYUDA PARA ELEGIR CATEGORIA

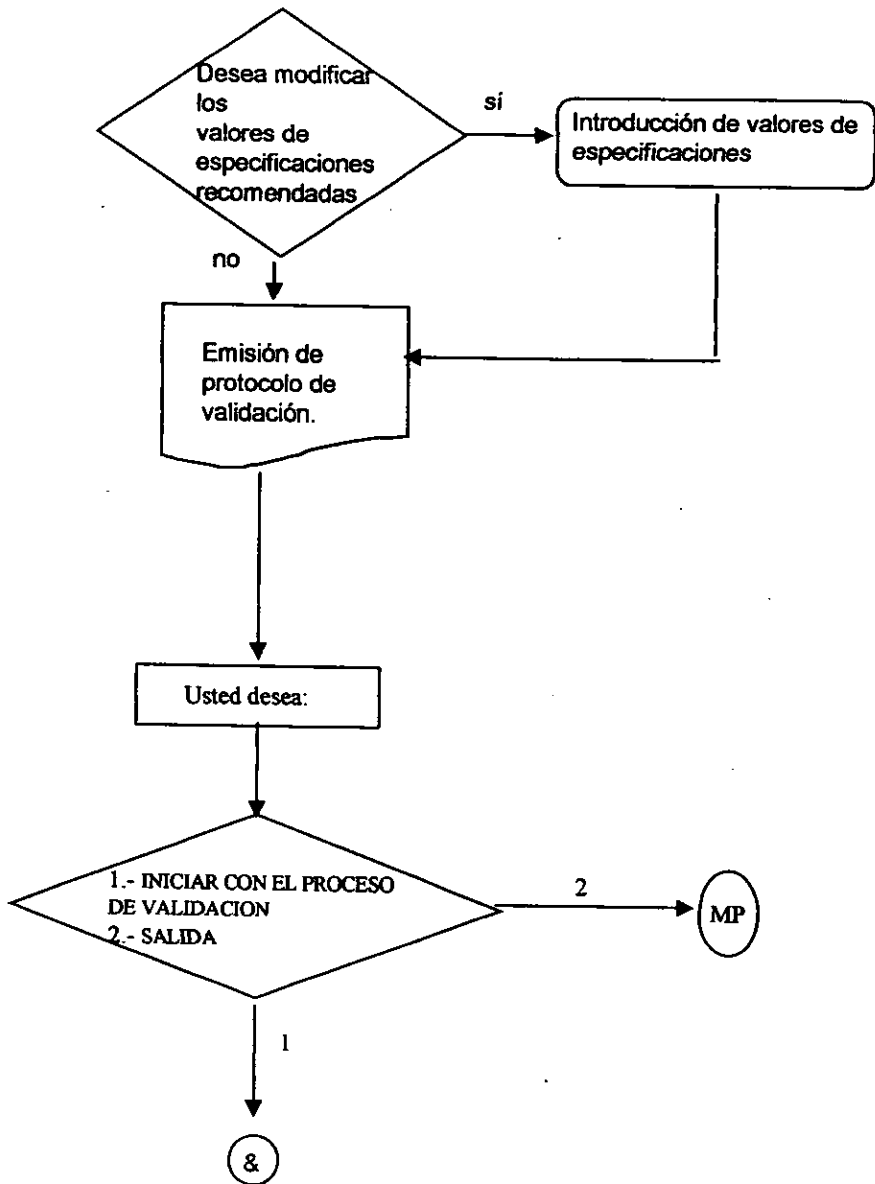
ayuda para elección de categoría

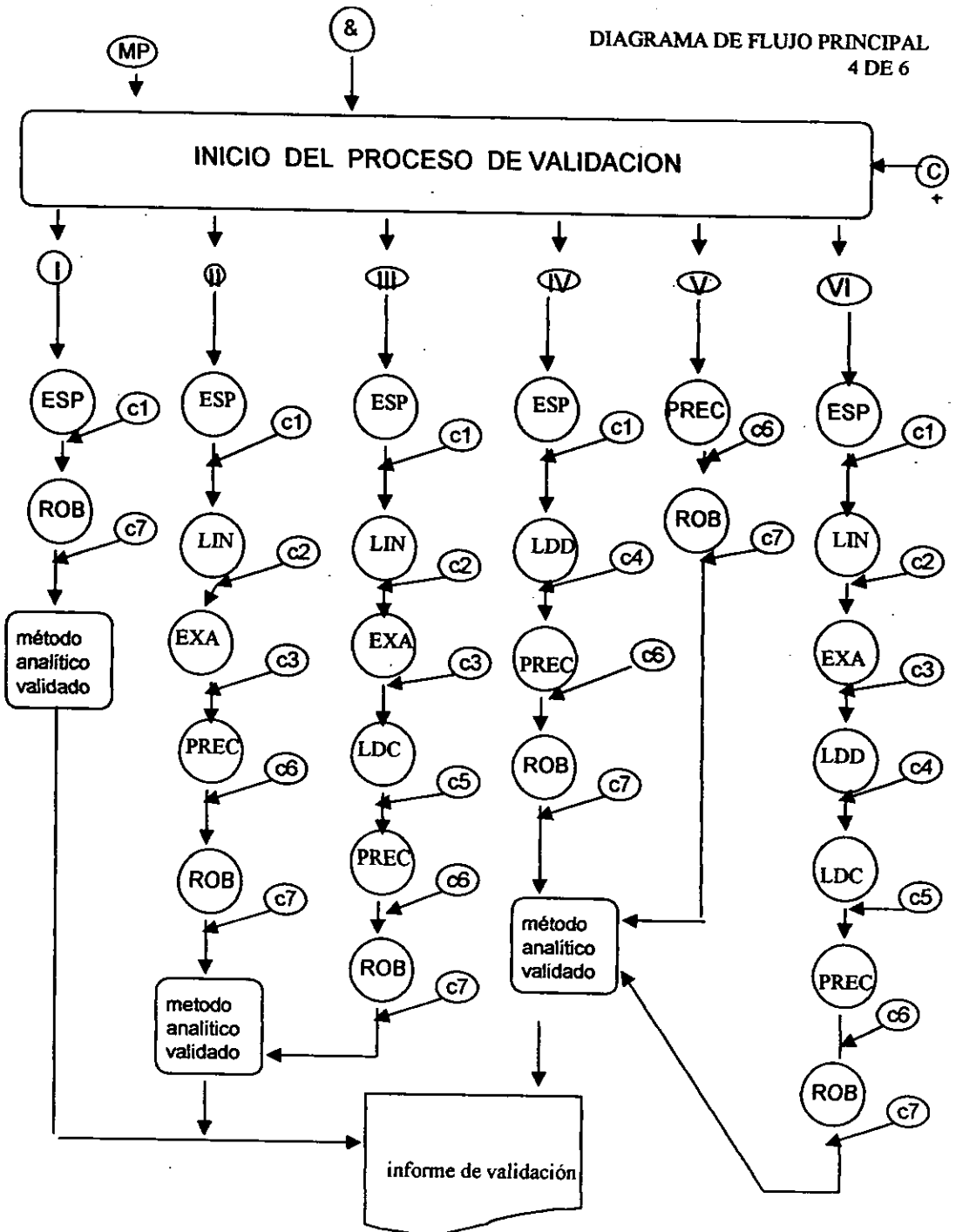
(B)
+

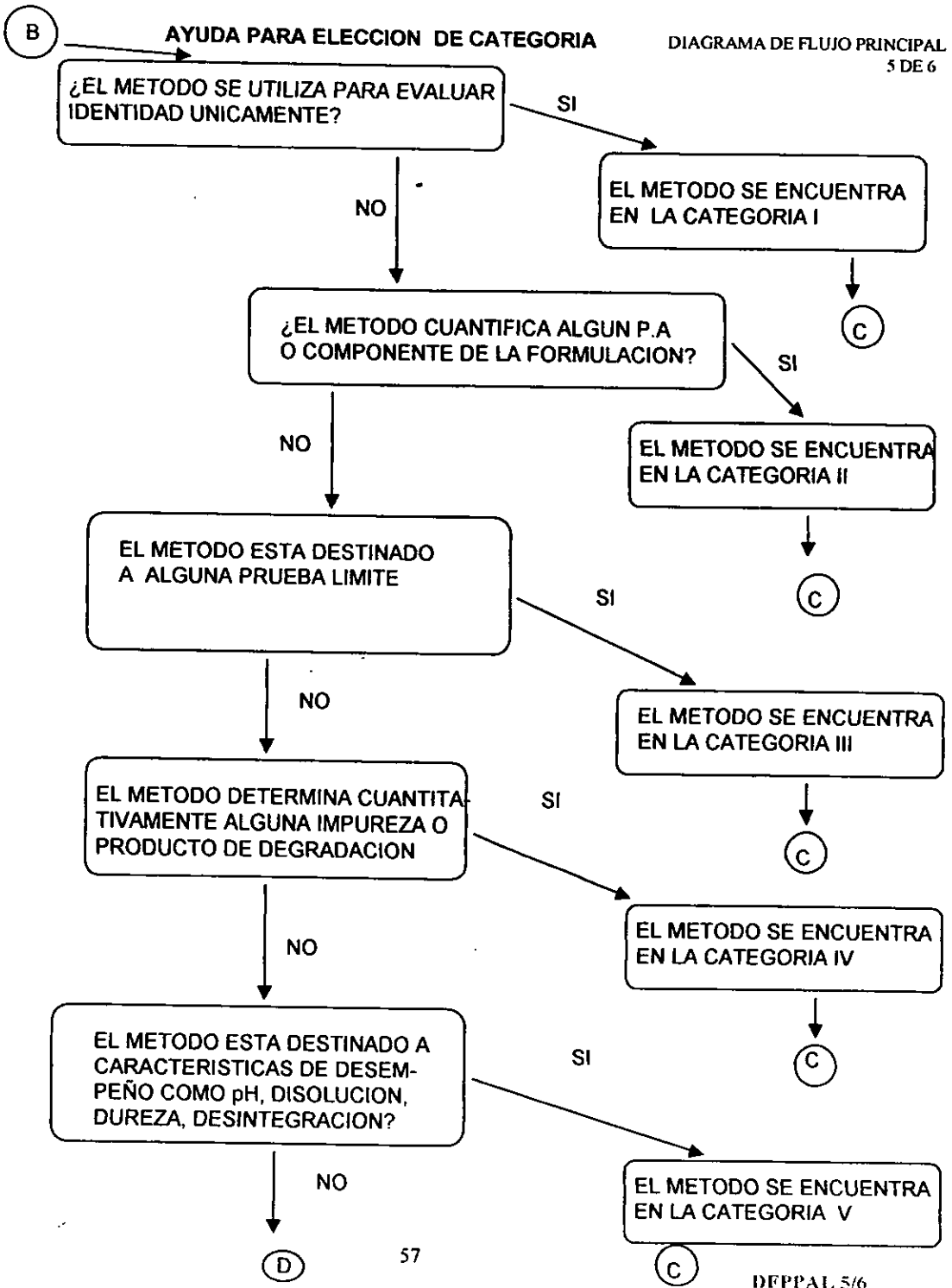


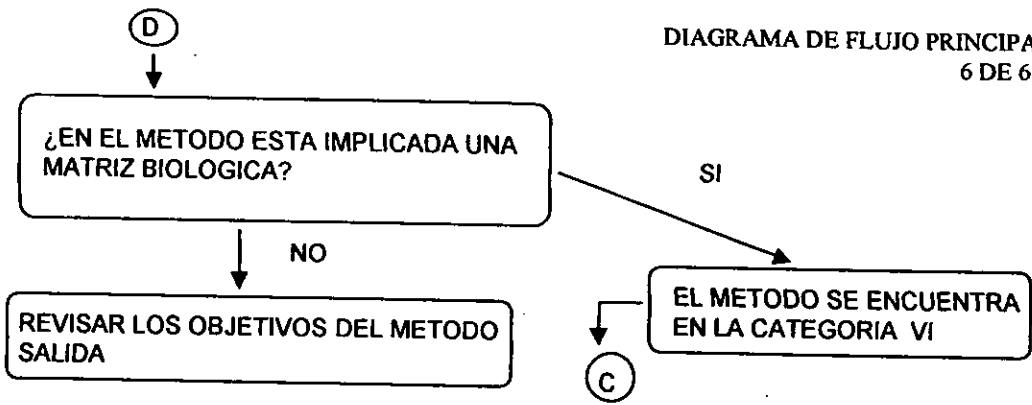
En función del tipo del método analítico elegido, se despliegan en pantalla los requerimientos de validación y los valores de especificaciones recomendadas acorde al siguiente esquema.

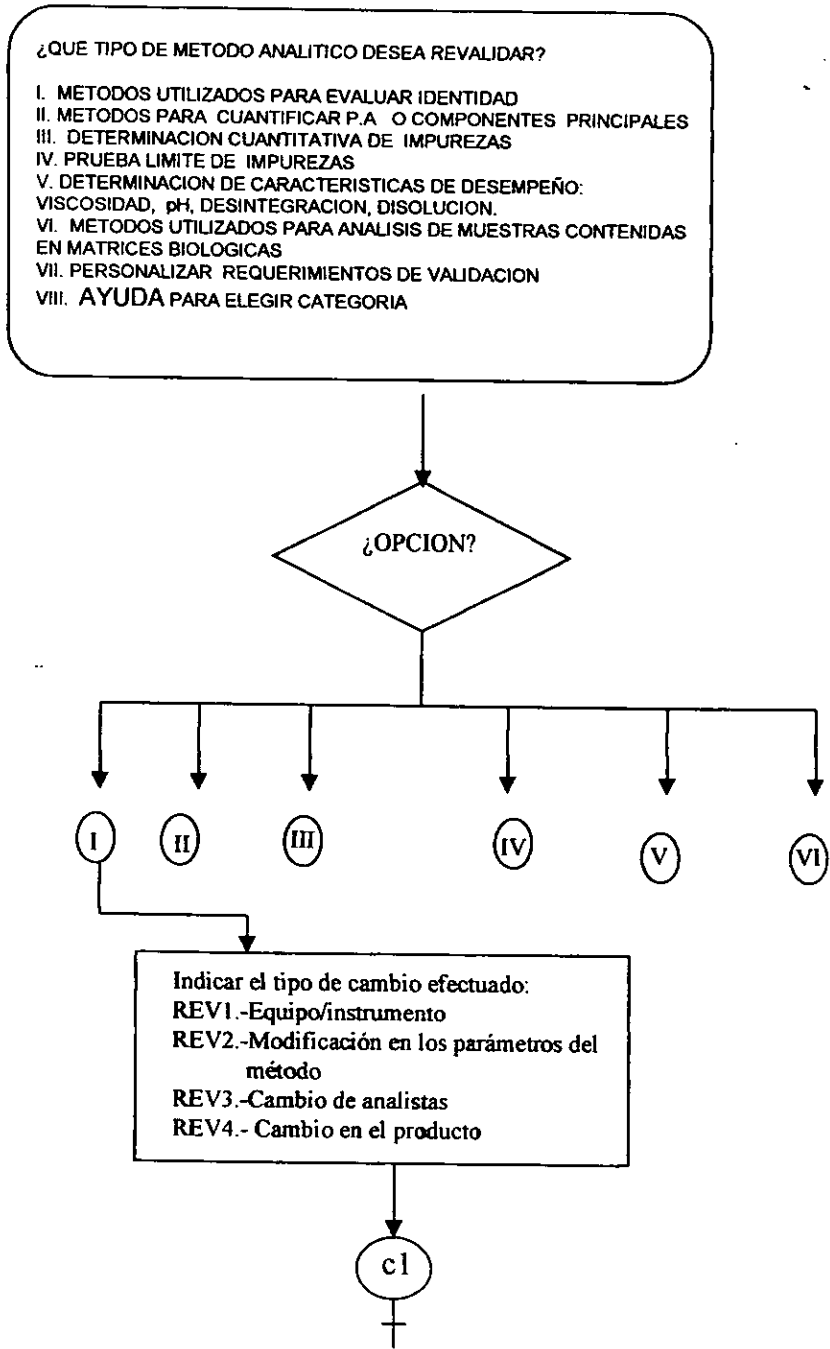
	Especificidad	Linealidad	Exactitud	Precisión	LDD*	LDC*	ROBUSTEZ
Ensayos utilizados para la evaluación de identidad	SI	NO	NO	NO	NO	NO	SI*
Métodos utilizados para cuantificación de principio activo	SI	SI	SI	SI	NO	NO	SI*
Det. cuantitativa de impurezas	SI	SI	SI	SI	NO	SI	SI*
Prueba límite de impurezas	SI	NO	NO	SI	SI	NO	SI*
Determinación de carac. de desempeño	NO	NO	NO	SI	NO	NO	SI*
Métodos en los que se cuenta con una matriz biológica.	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI*
Especificaciones recomendadas	Ansencia de interferencia	$r^2 > 0.98$	recobro= 98-102%	DER<2.0 por ciento	3:1 señal de ruido	10:1 señal de ruido	inalteración de resultados en una variedad de condiciones.

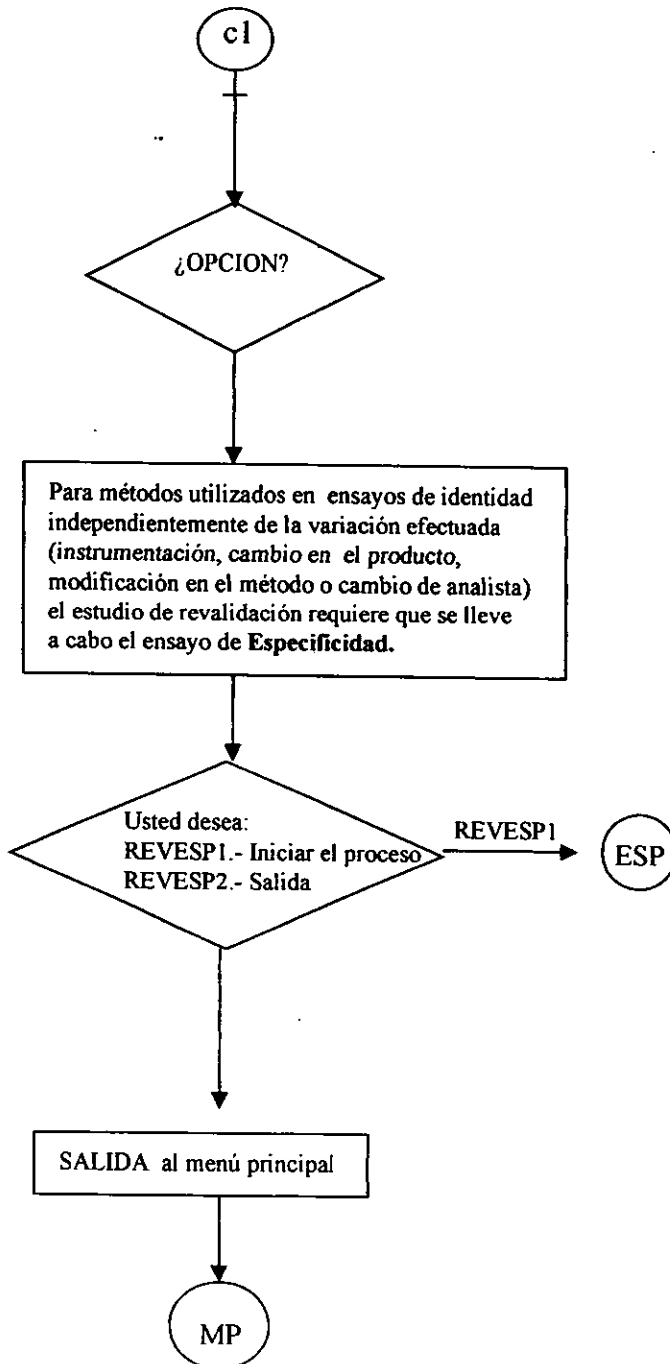


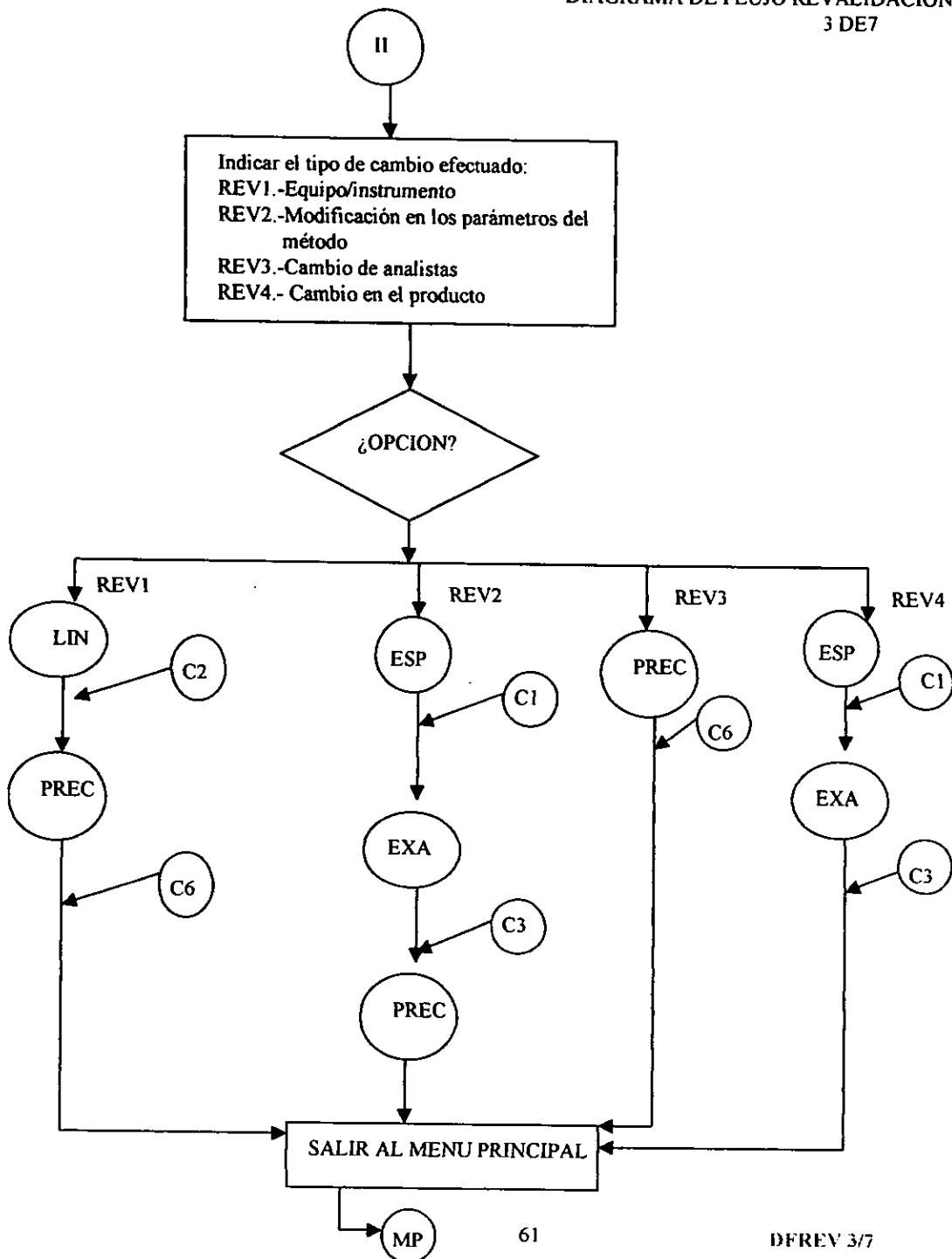


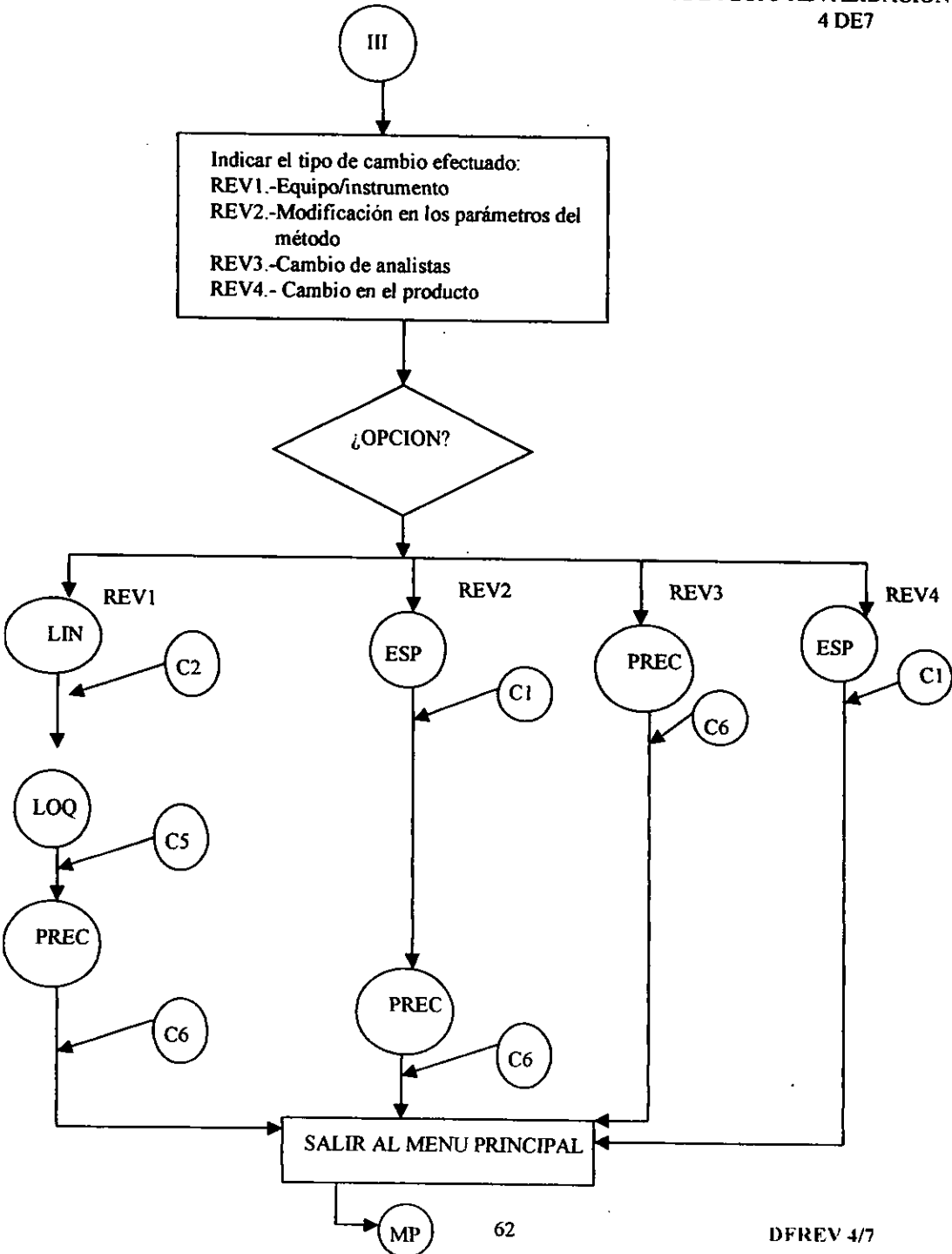


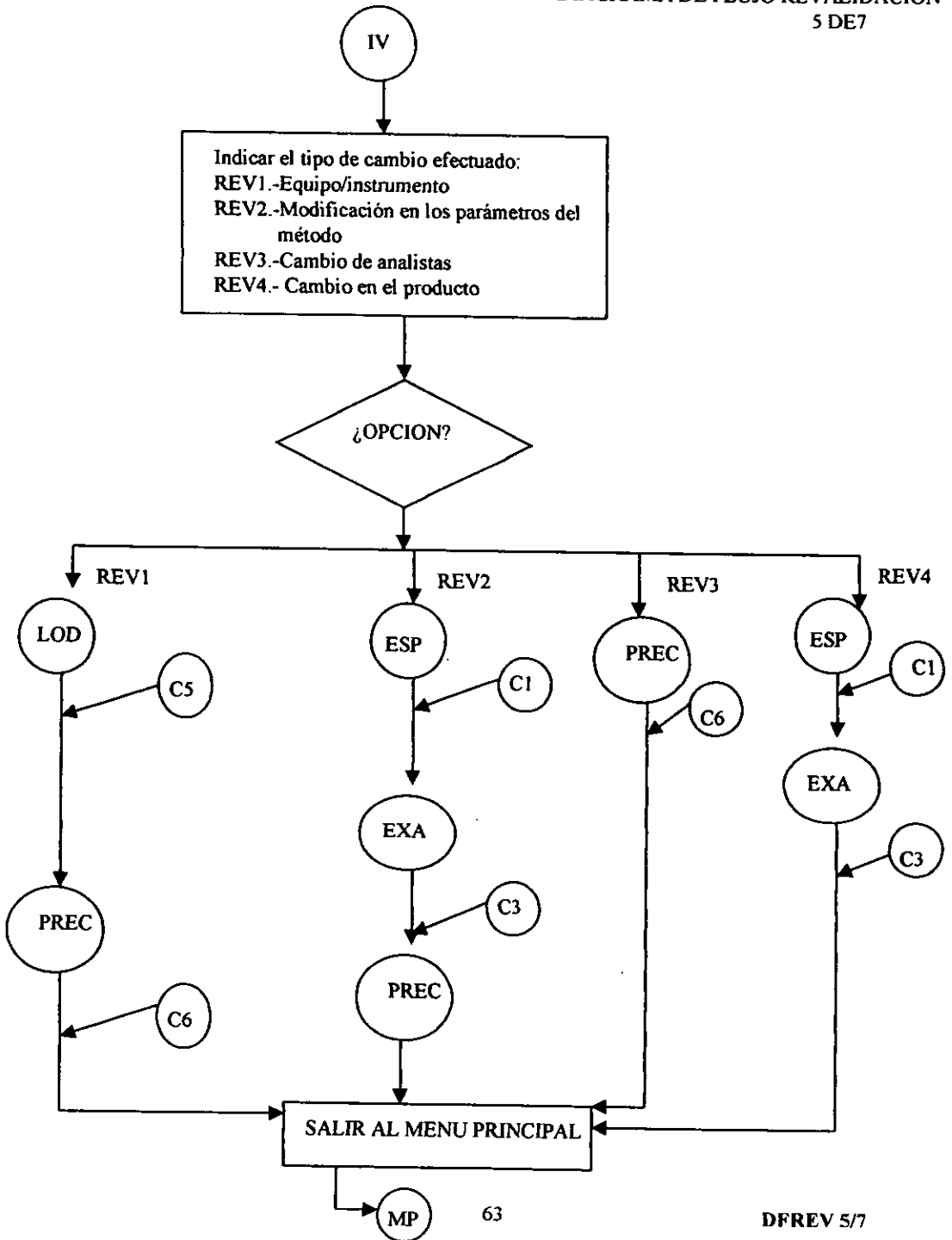












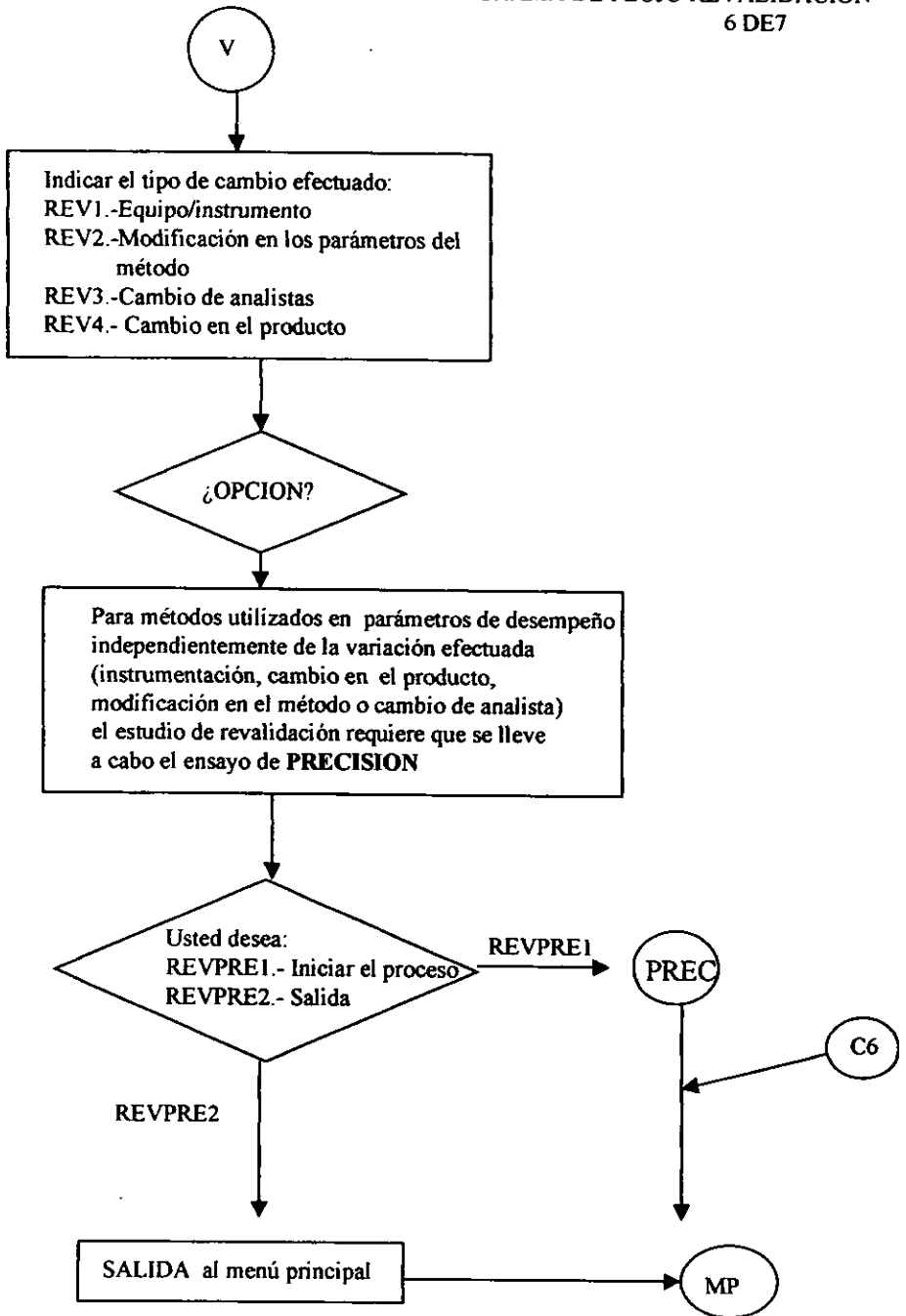
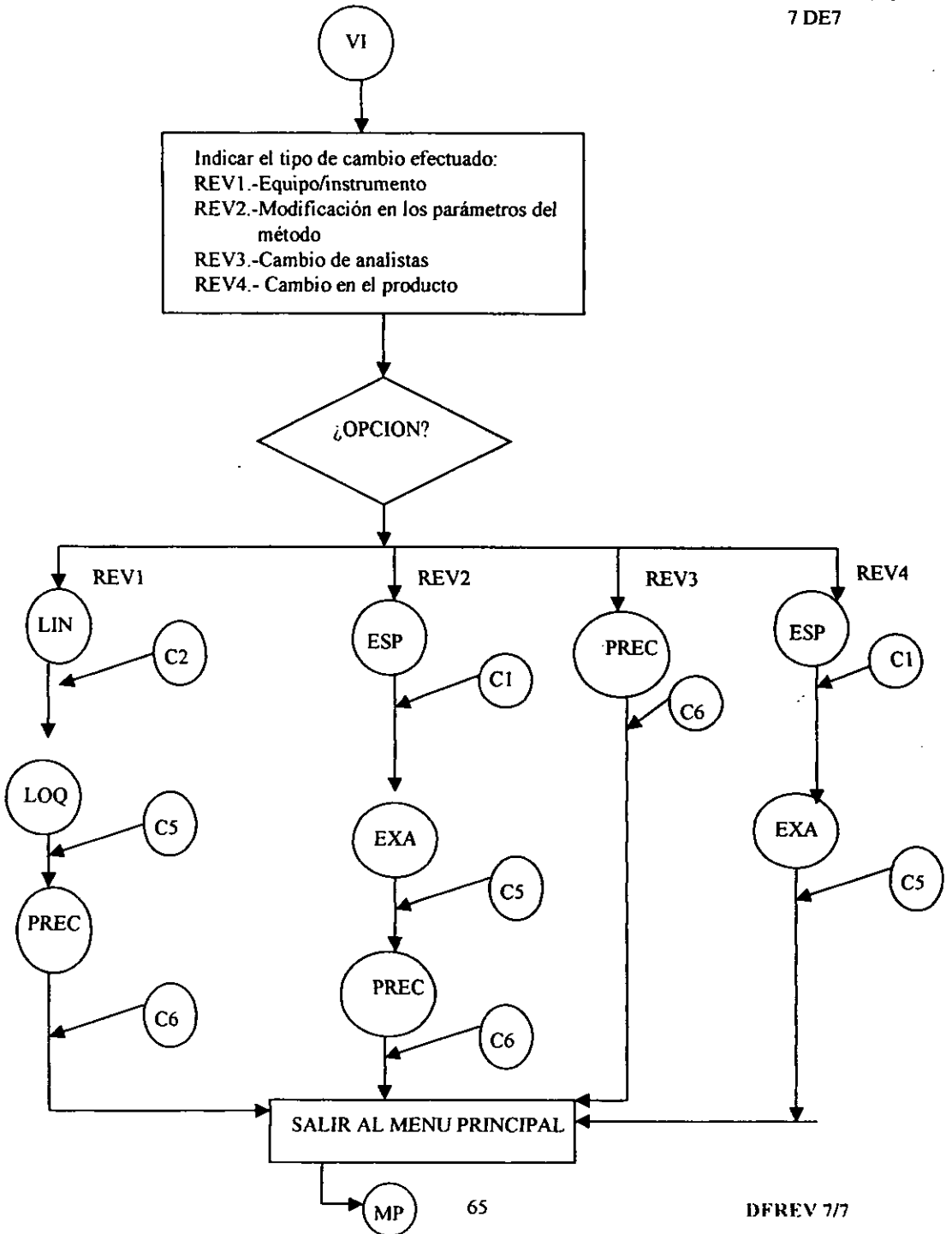
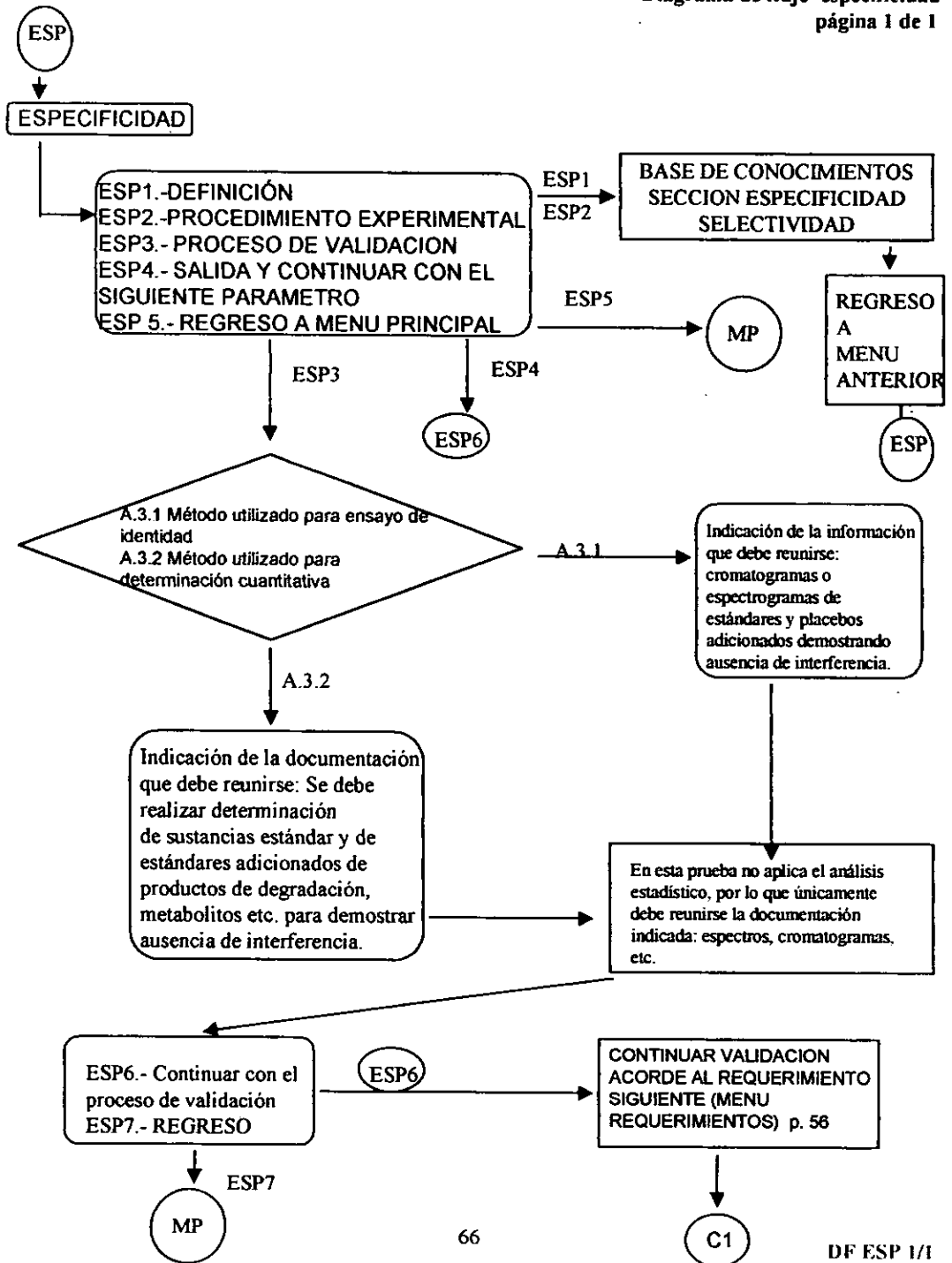
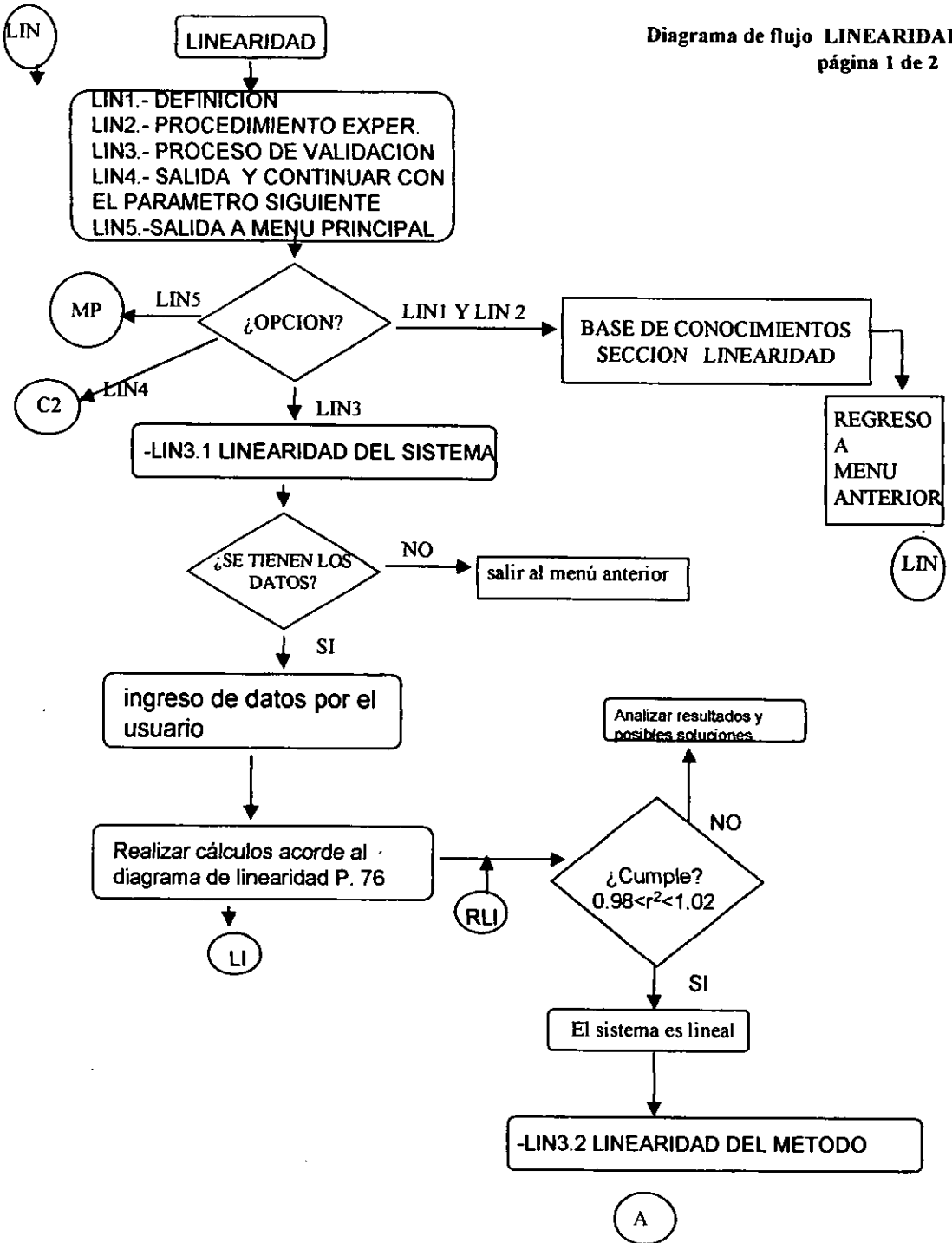
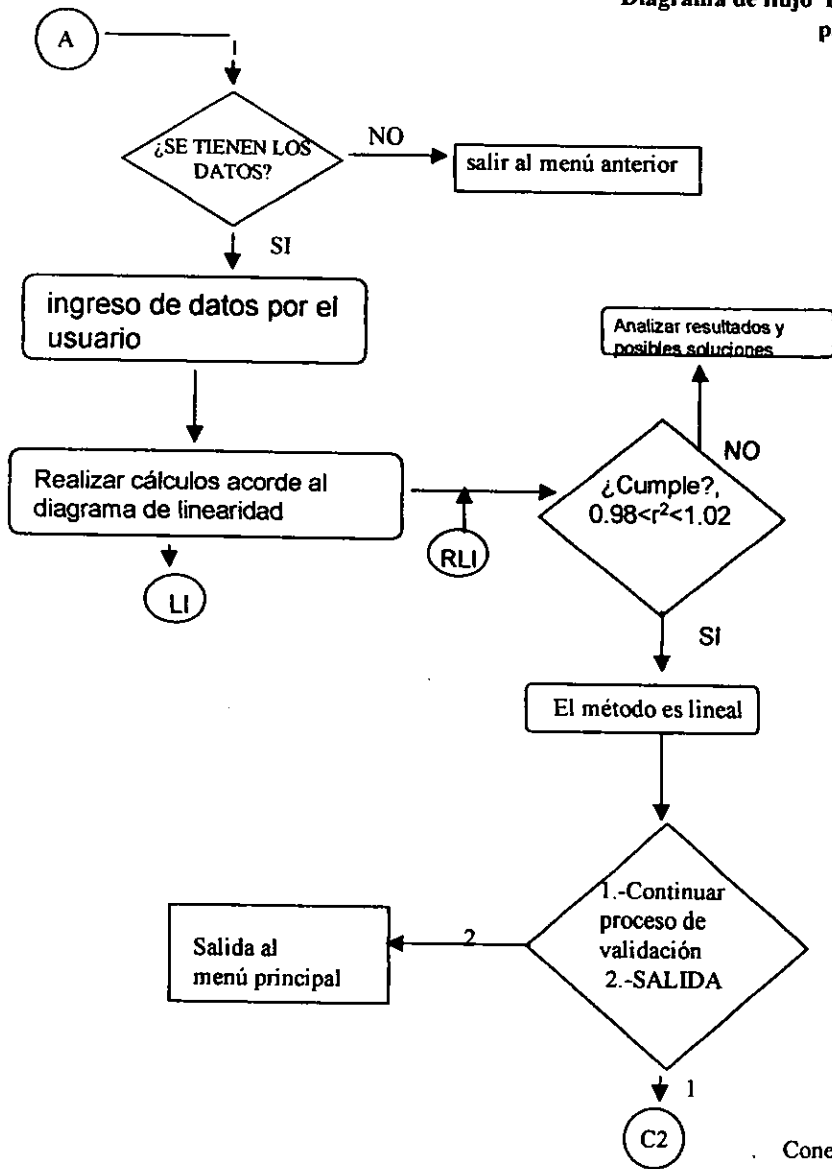


DIAGRAMA DE FLUJO REVALIDACION
7 DE 7

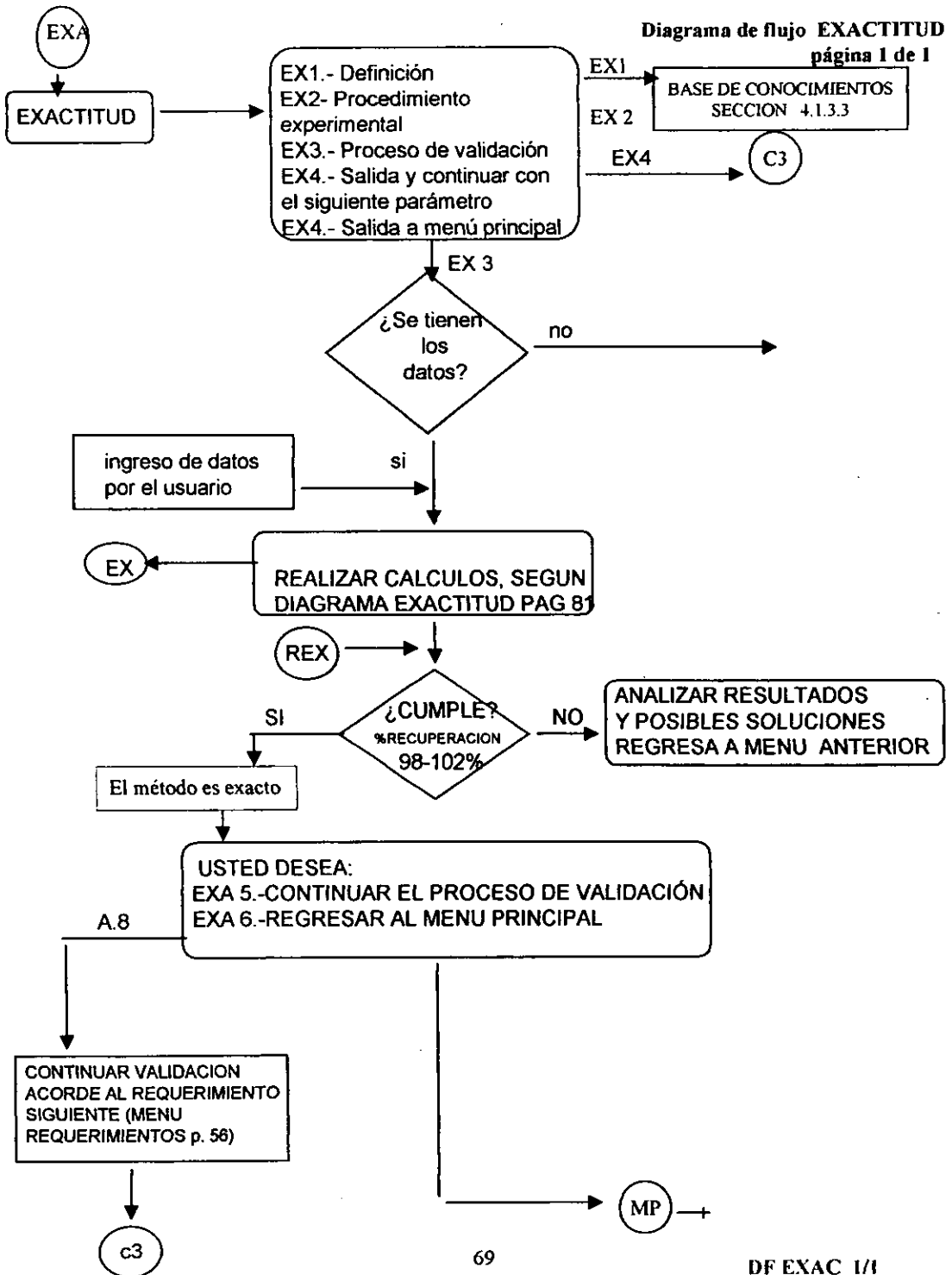


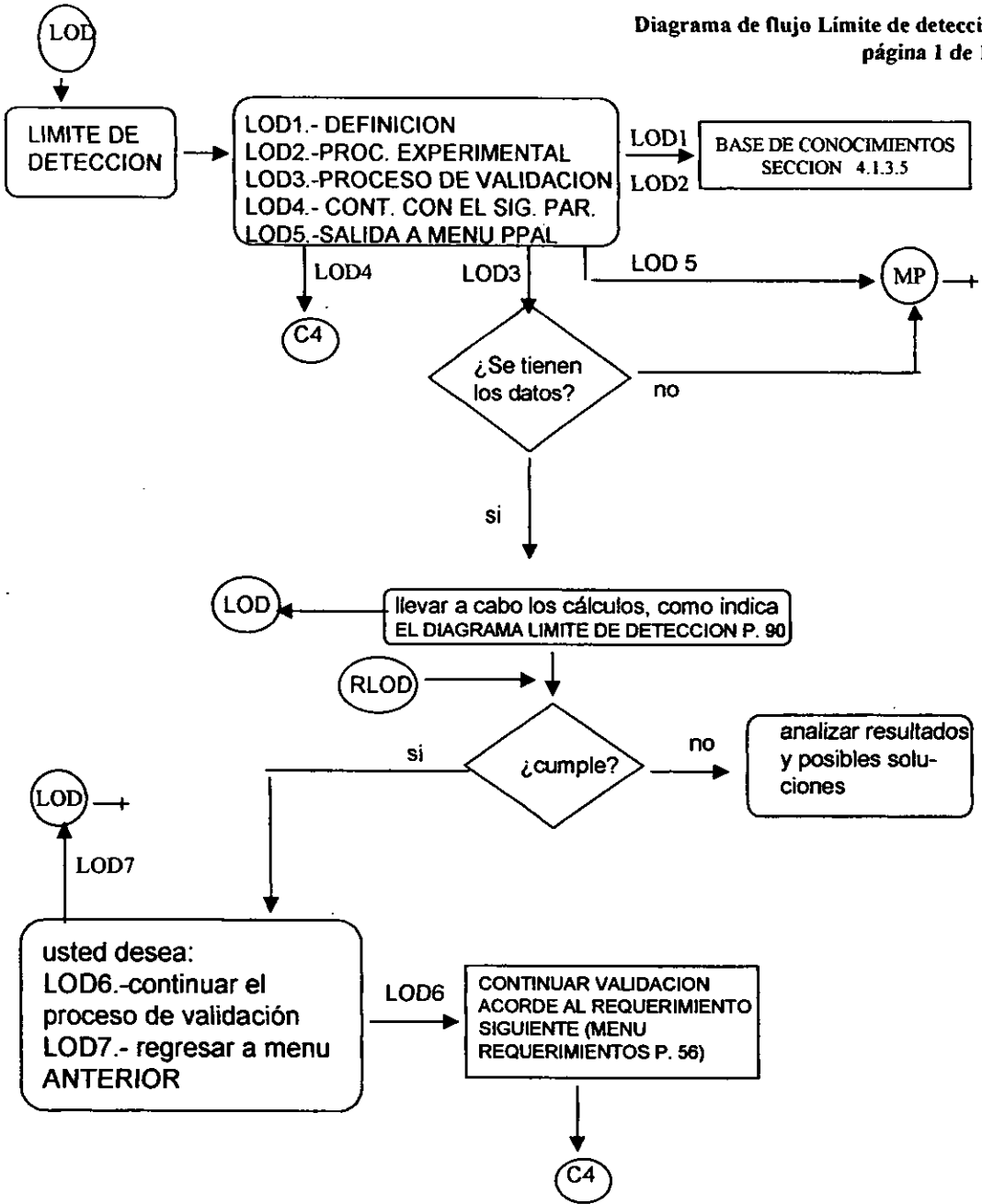


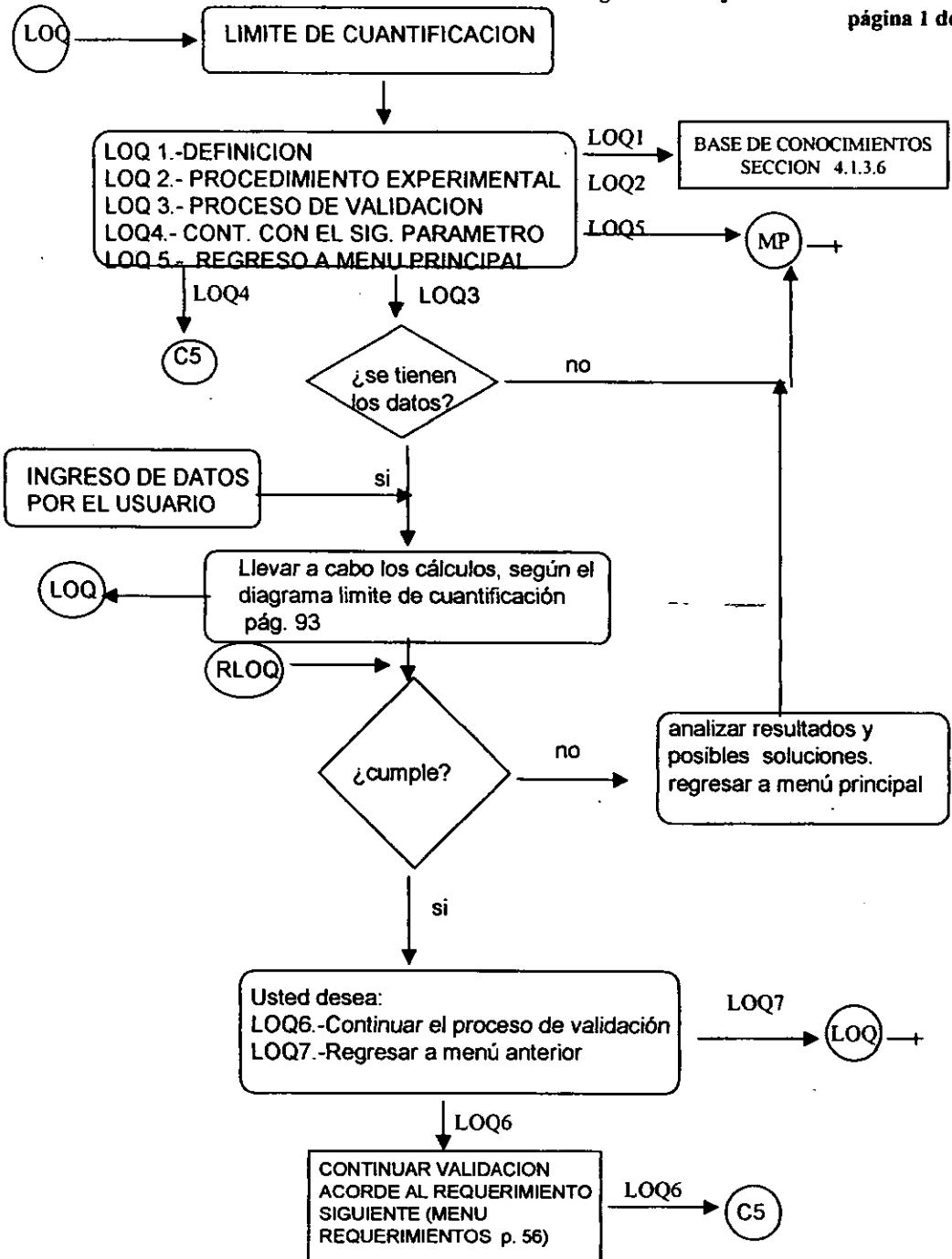


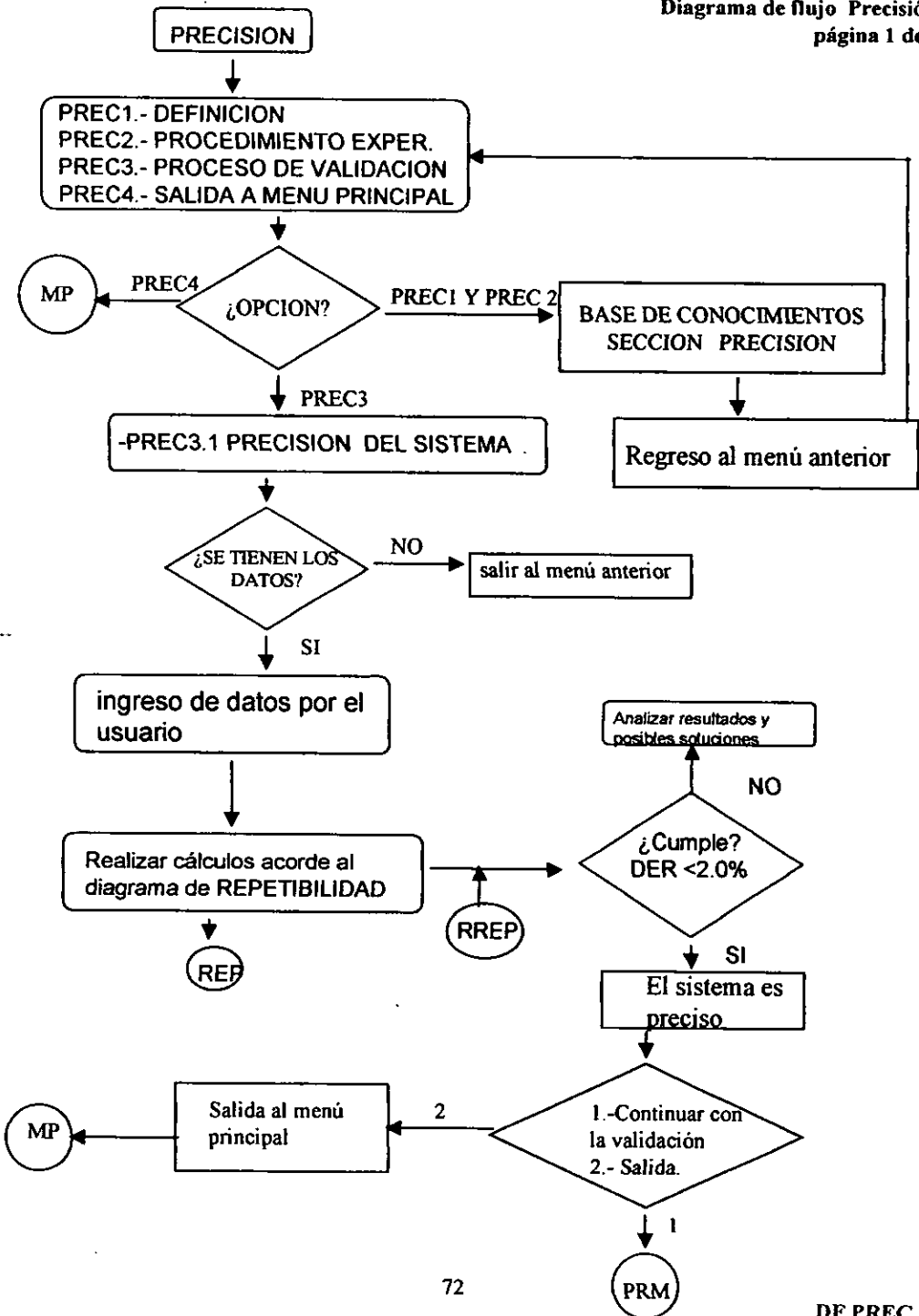


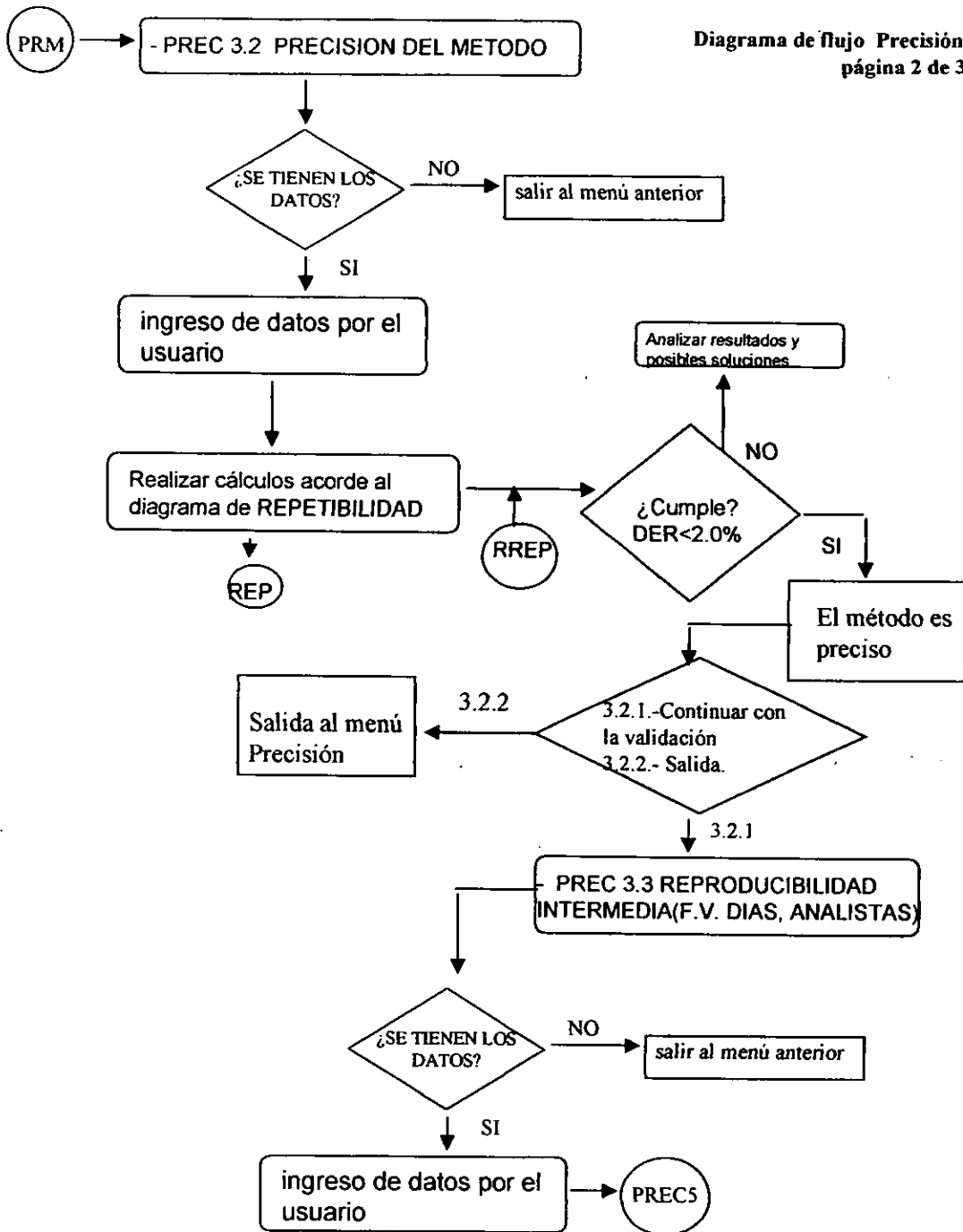
Conector C2
página 56

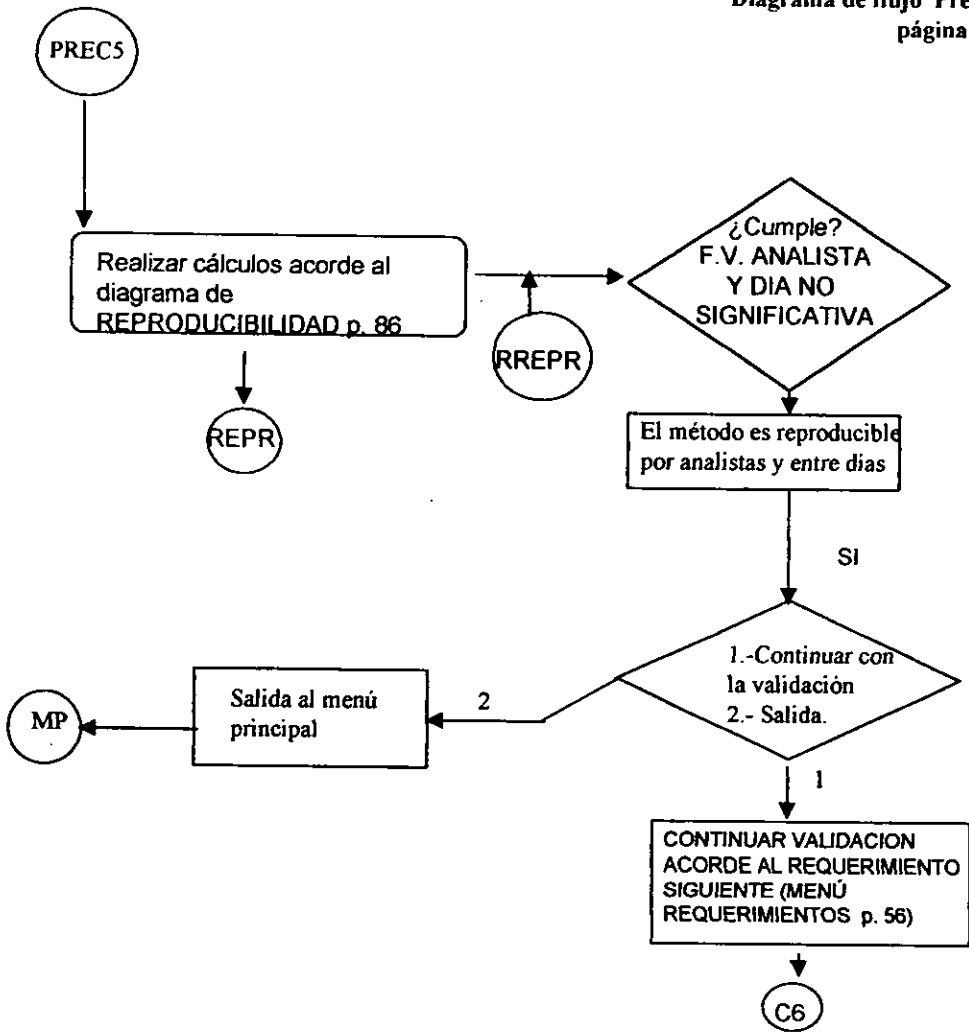


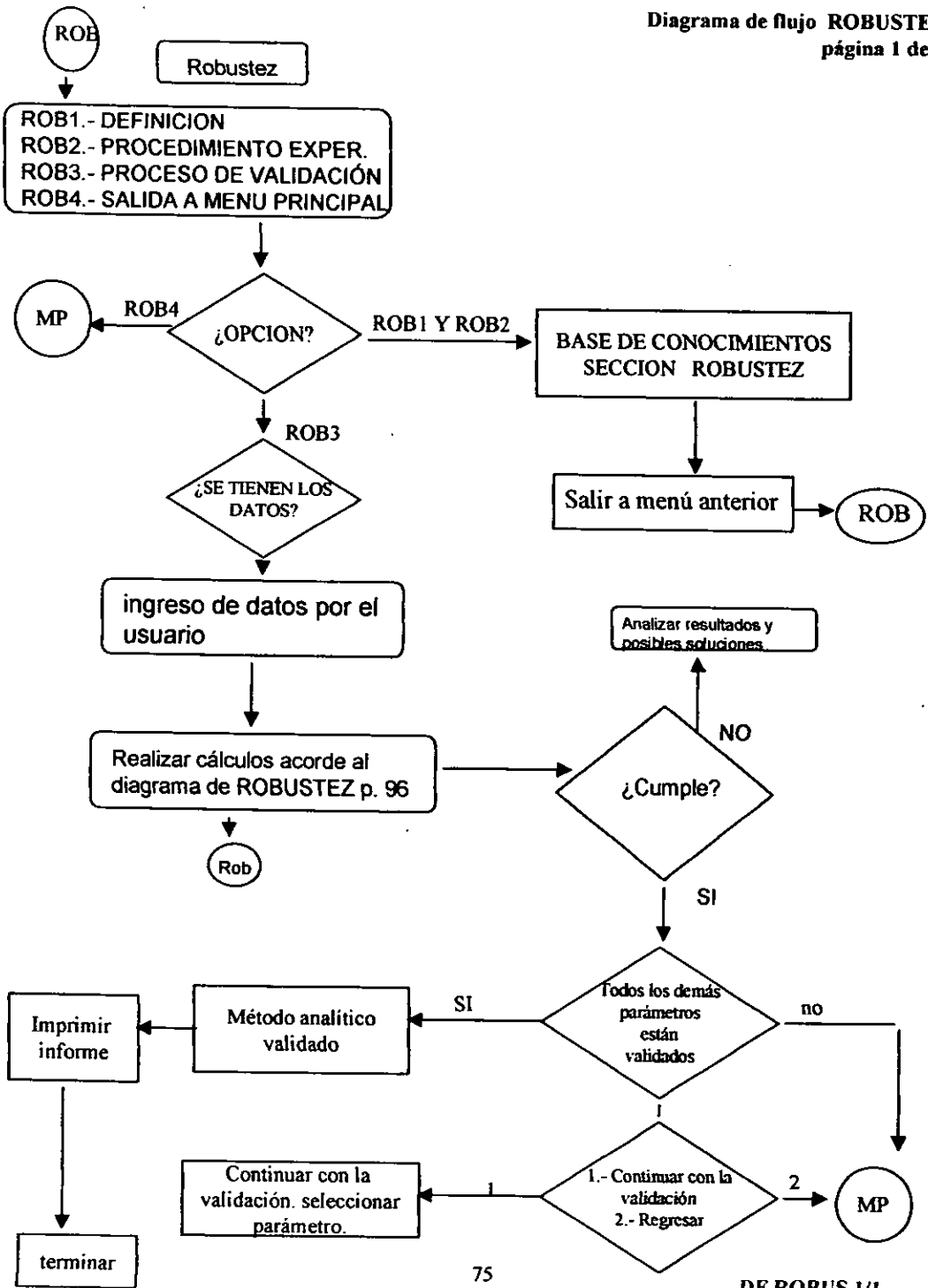


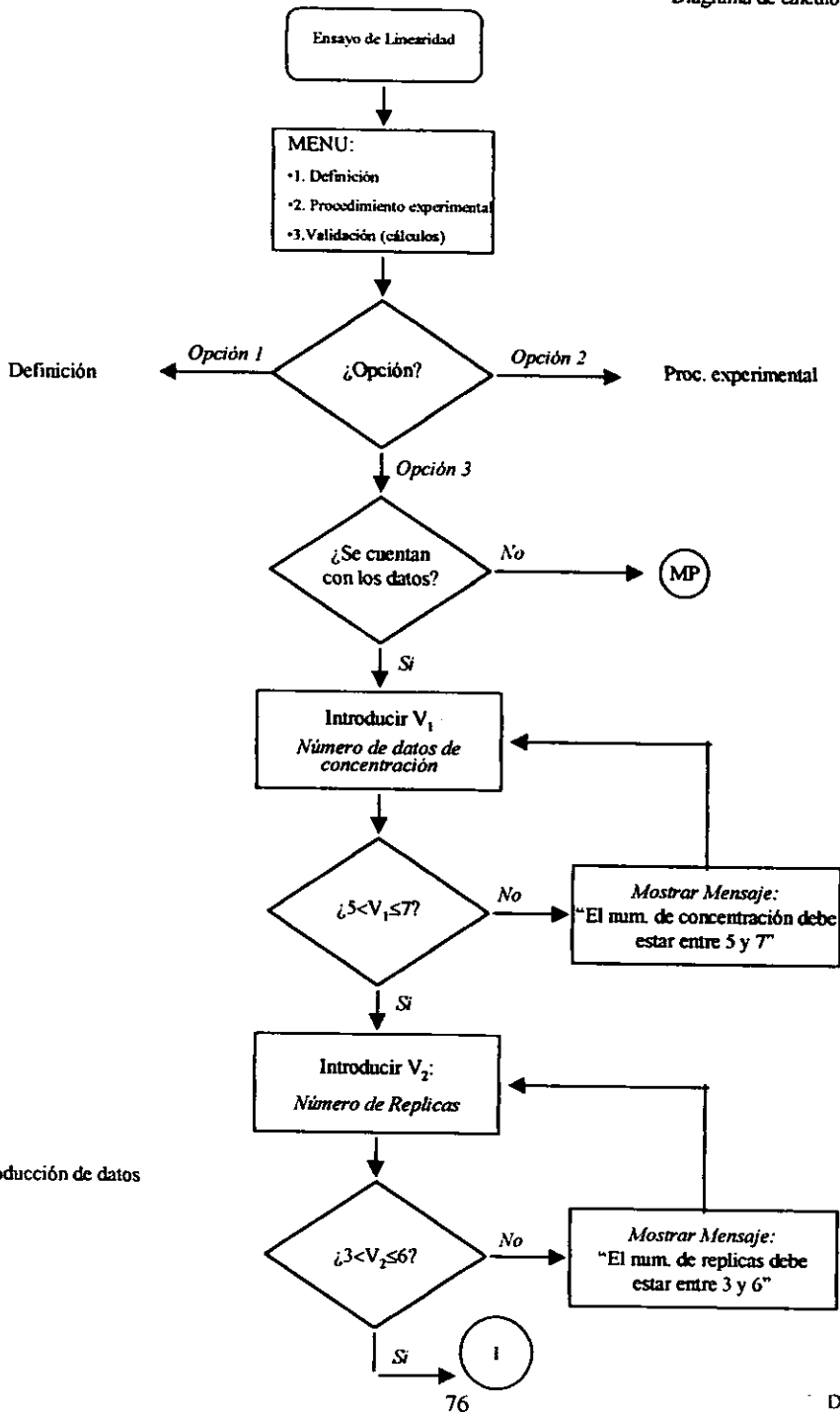






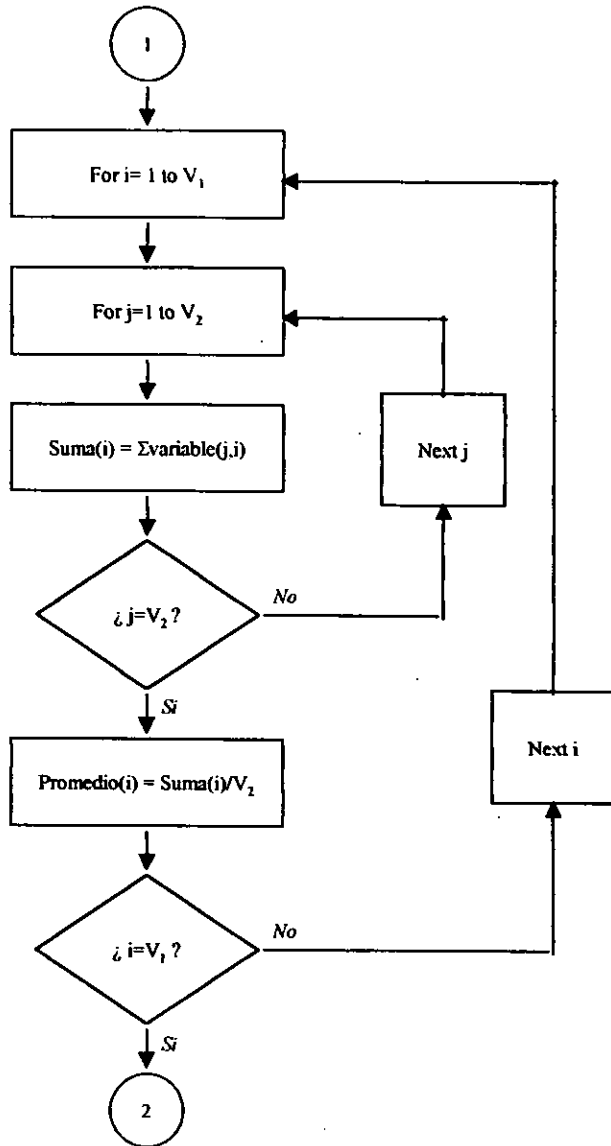


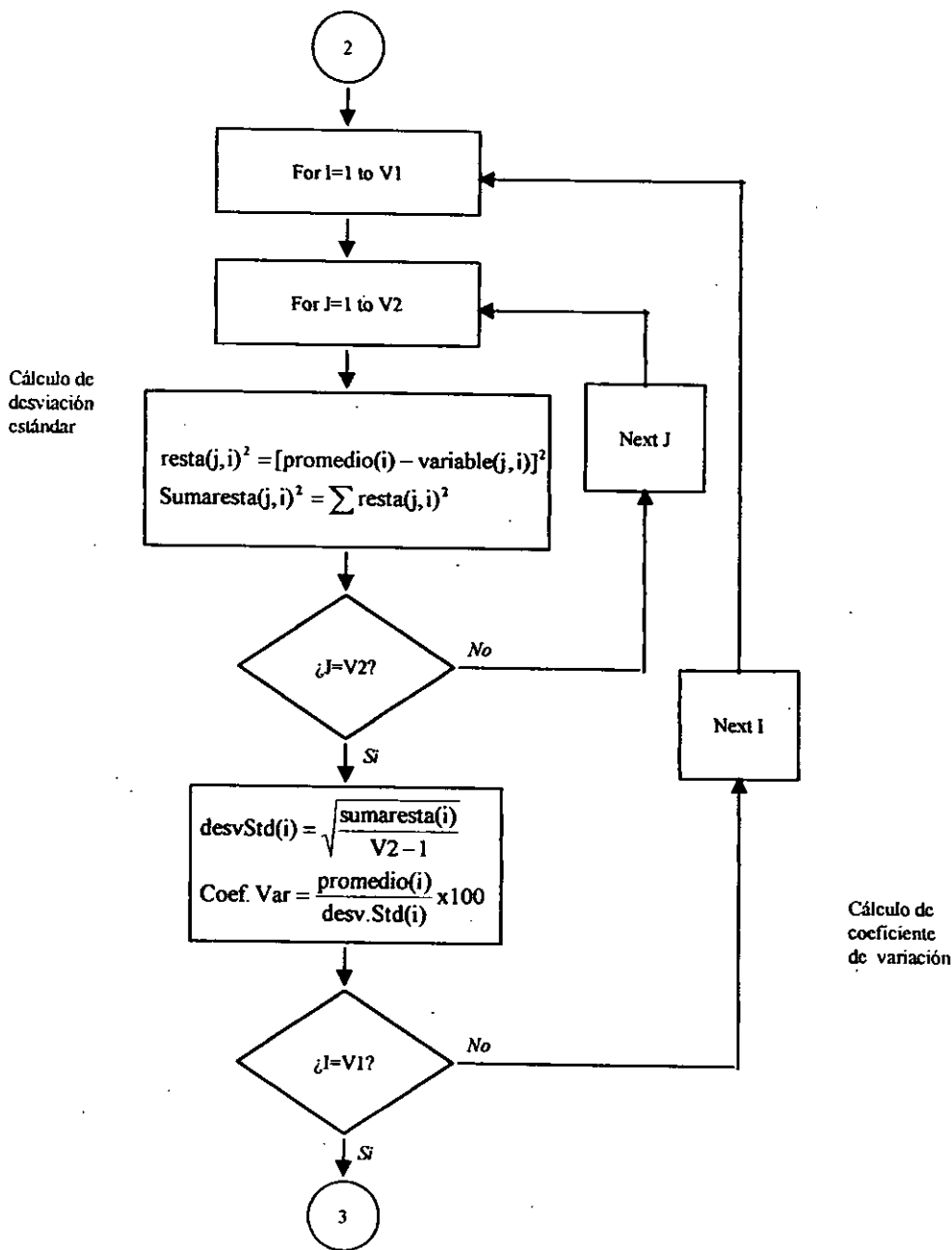




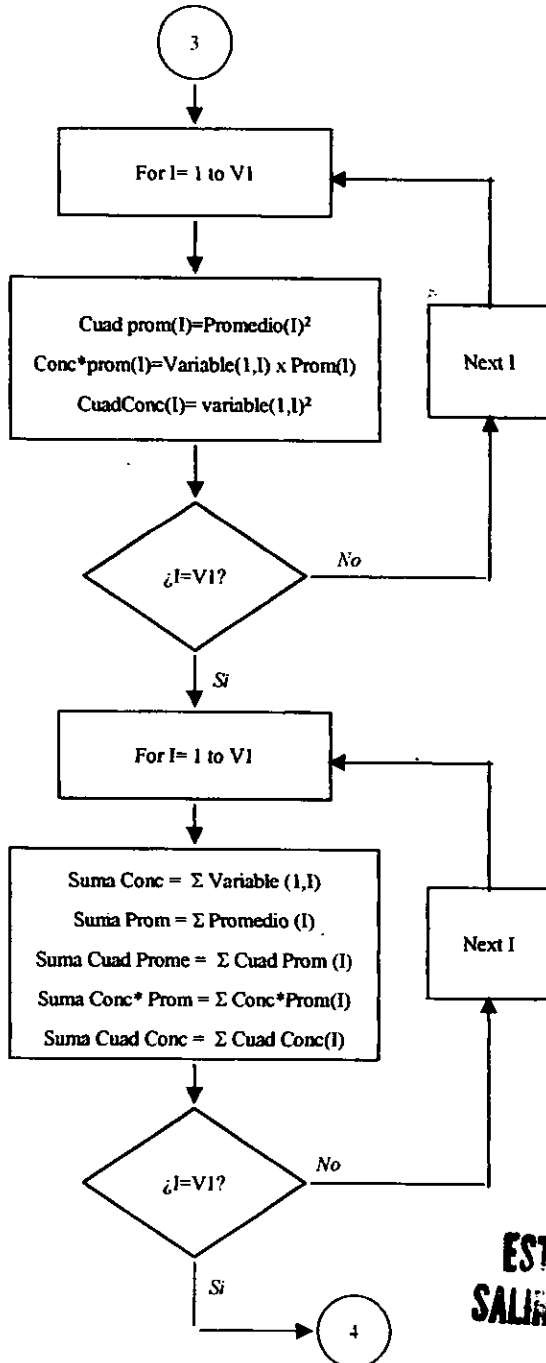
Introducción de datos

Cálculo de promedio

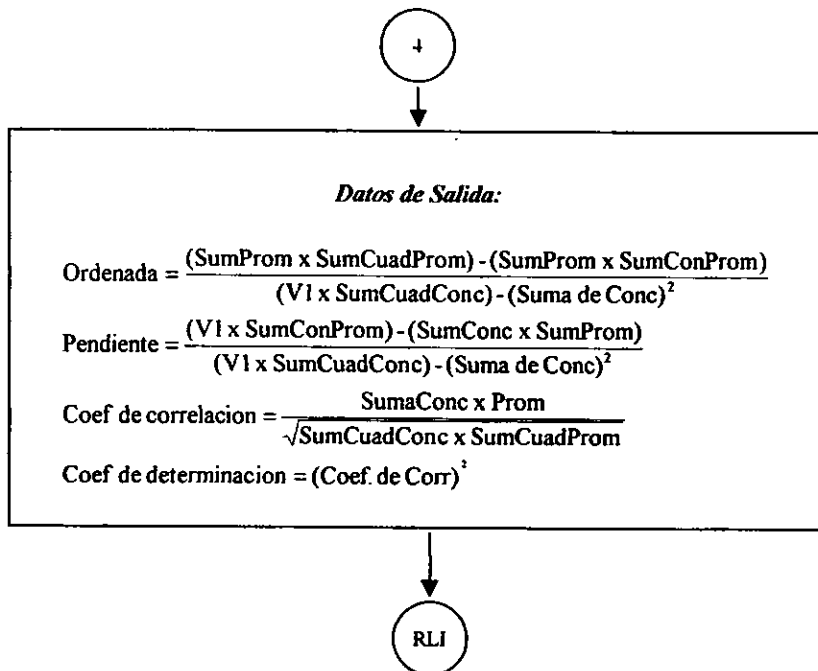




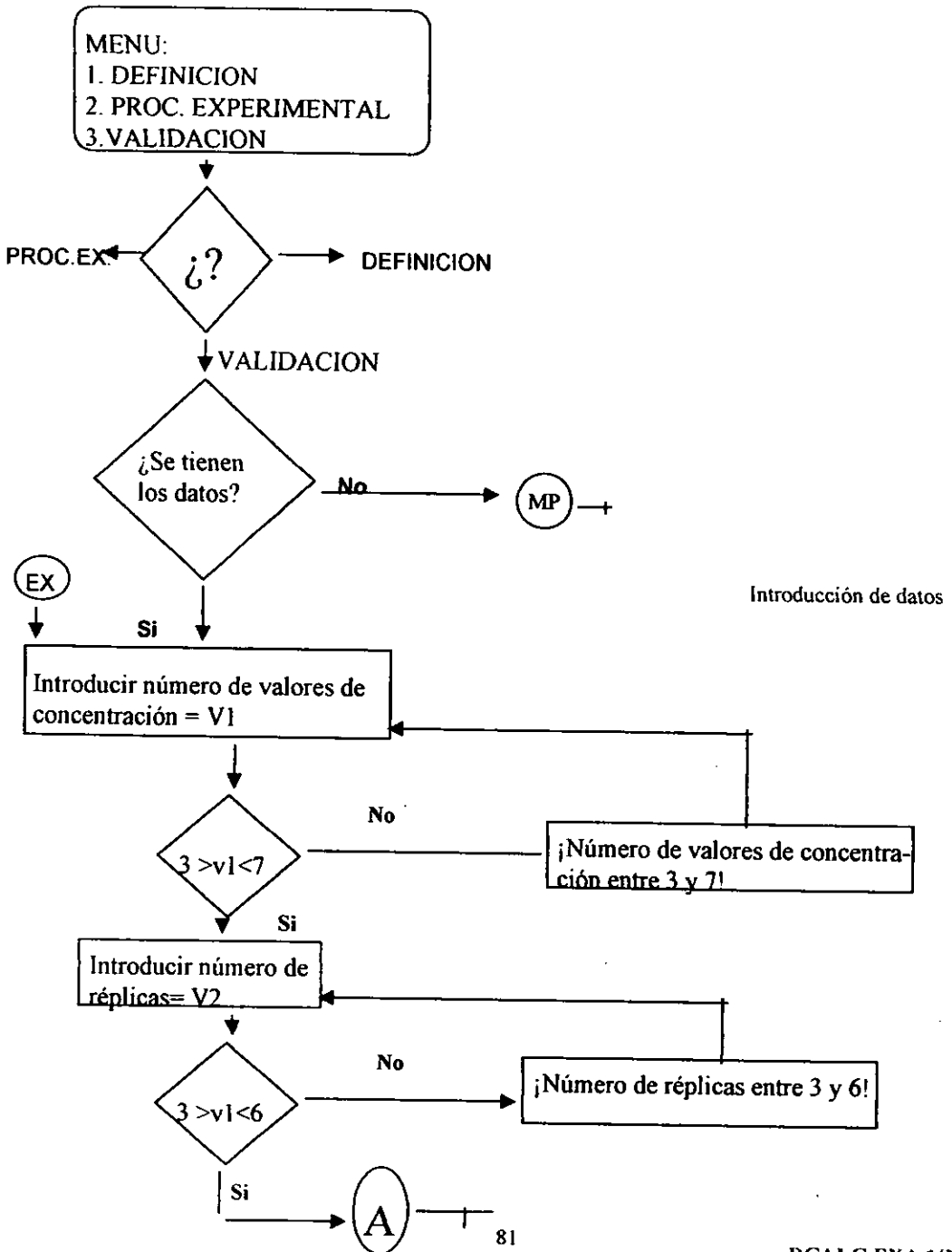
Cálculo de
parámetros
de regresión



**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

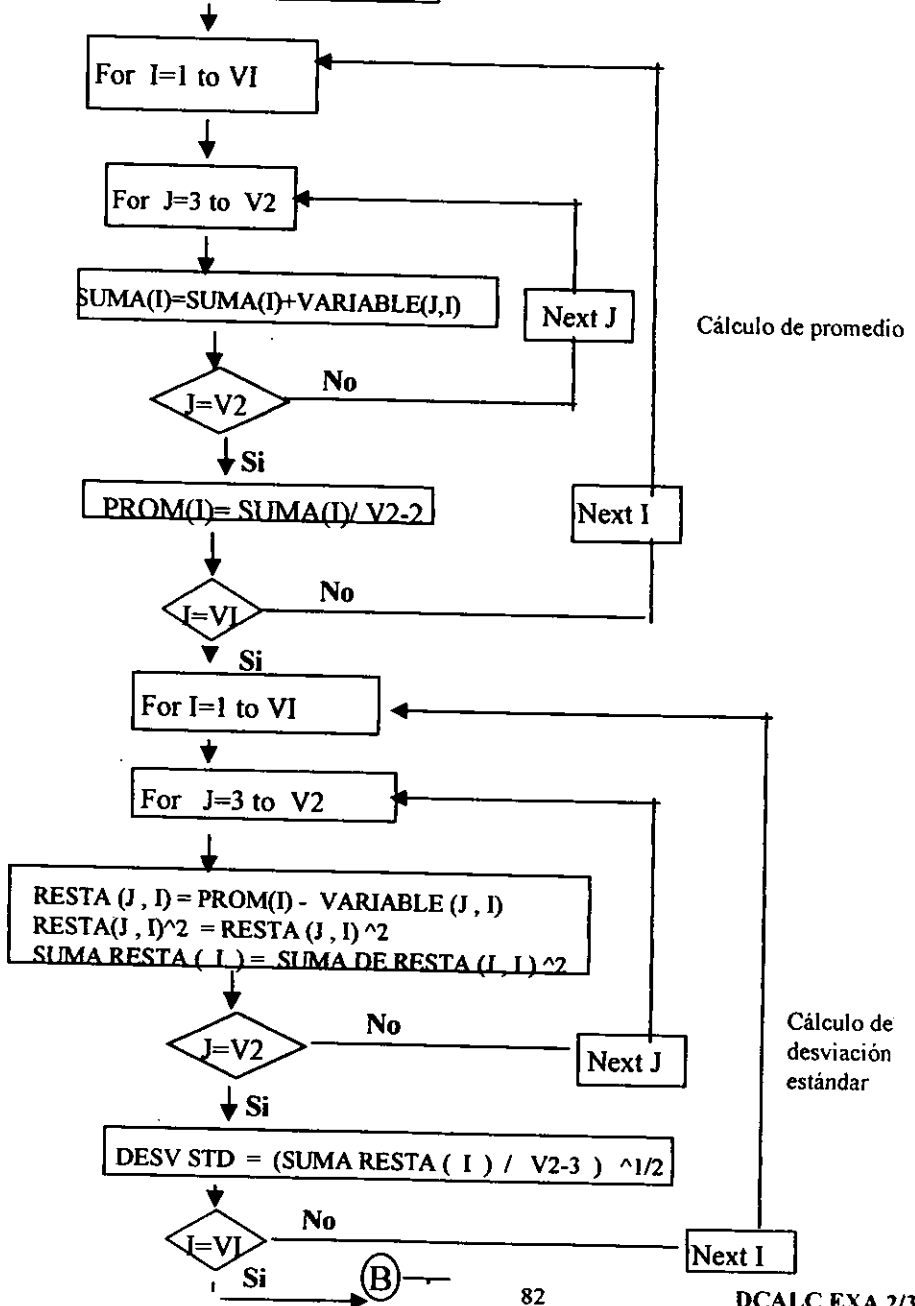


ENSAYO DE EXACTITUD



(A)

Introducir datos de
 Concentración VARIABLE (1, I)
 % Agregado VARIABLE(2, I)
 Respuesta VARIABLE (I, J)



Cálculo de desviación estándar

For I = 1 to VI

COEFVAR(I) = DESVSTD(I)/PROM(I) * 100
 %RECUP(I) = PROM(I) / VARIABLE(1,I) * 100

I=VI

Next I

For I = 1 to VI

CUAD REC(I) = %RECUP(I) ^2
 %RECUP*%AGREG(I) = VARIABLE (2,I)*%RECUP(I)
 CUAD%AGREG(I) = VARIABLE(2,I) ^2
 SUM%AGREG= SUMA (VARIABLE (2,I))
 SUM%RECUP=SUMA (%RECUP(I))
 SUM CUAD%REC=SUMA (CUAD REC(I))
 SUM%REC*%AGREG= SUMA(%RECUP*%AGREG(I))
 SUM CUAD%AGREG= SUMA(SUM CUAD%AGREG(I))

I=VI

NO

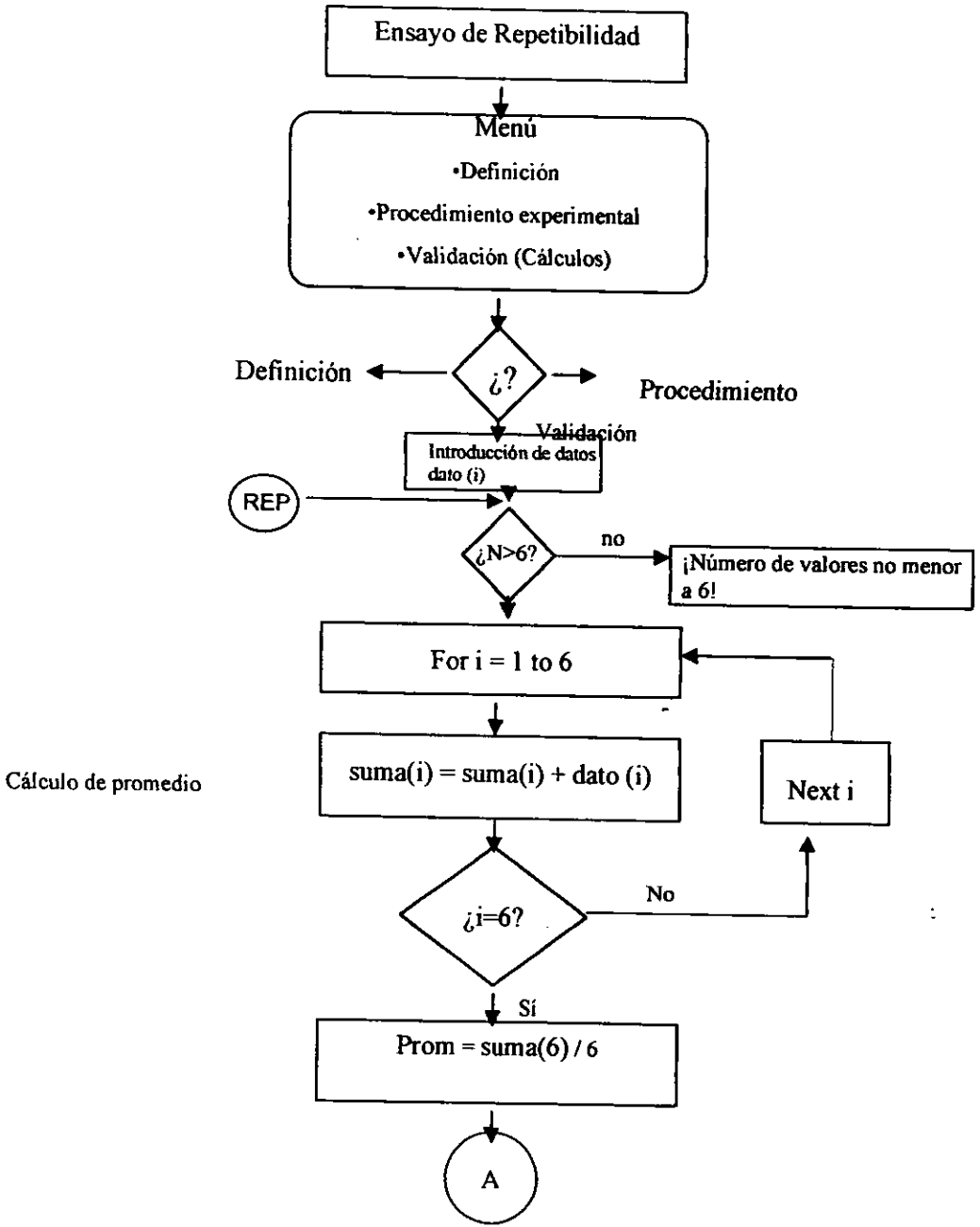
Next I

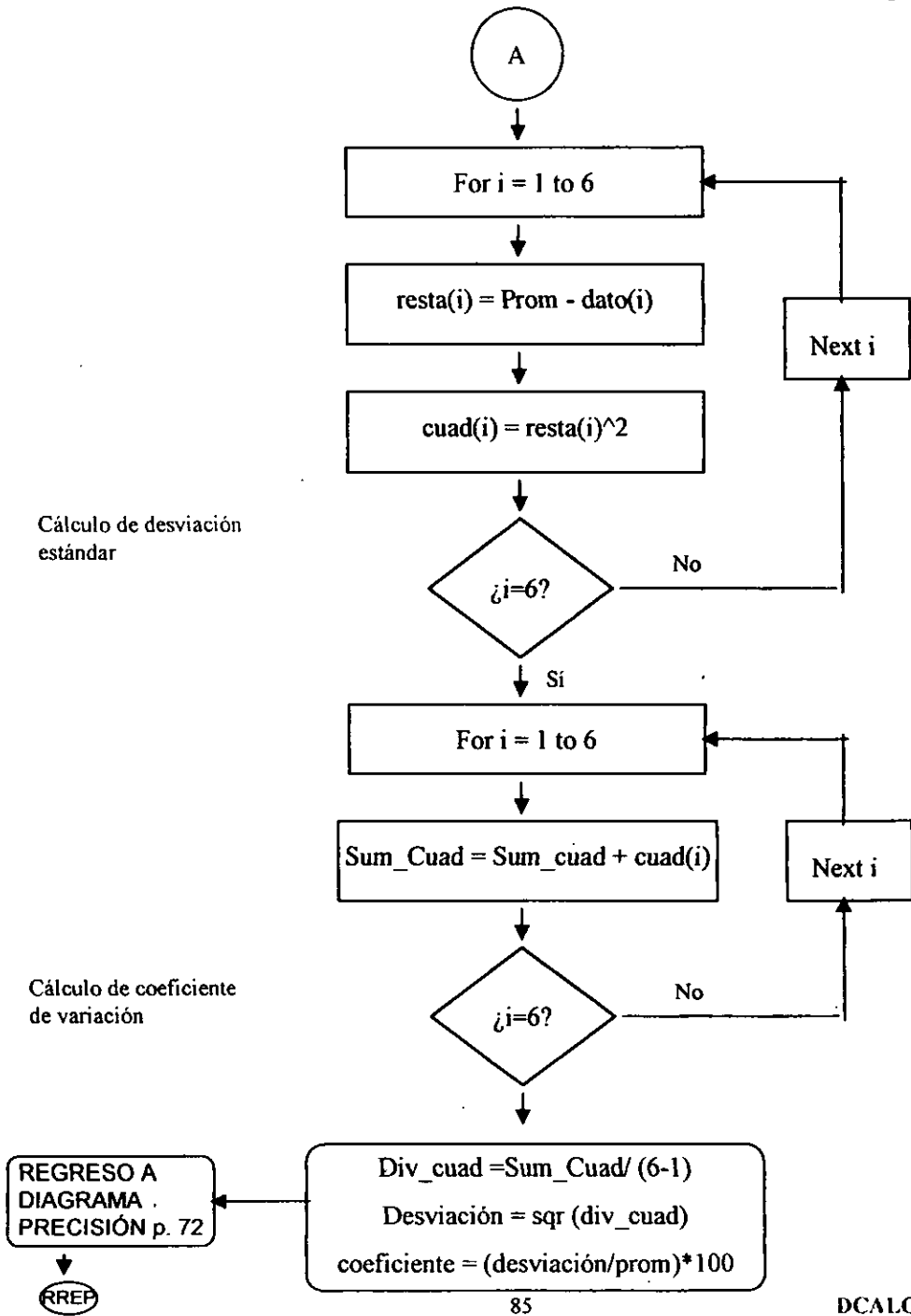
Cálculos de regresión

Pendiente= $((v1 * (sum \%rec * \%agreg)) - (sum \%agreg * (sum \%recup))) / ((v1 * sum cuad \%agreg) - (sum \%agreg) ^2)$
 ordenada= $(sum cuad \%agreg * sum \%recup) - (sum \%agreg * sum \%rec * \%agreg) / (v1 * sum cuad \%agreg) - (sum \%agreg) ^2$
 coefcorr = $sum \%agreg * \%rec / \text{sqr}(sum cuad \%agreg * sum cuad \%rec)$

REGRESO diagrama de flujo exactitud DFEXA p. 69

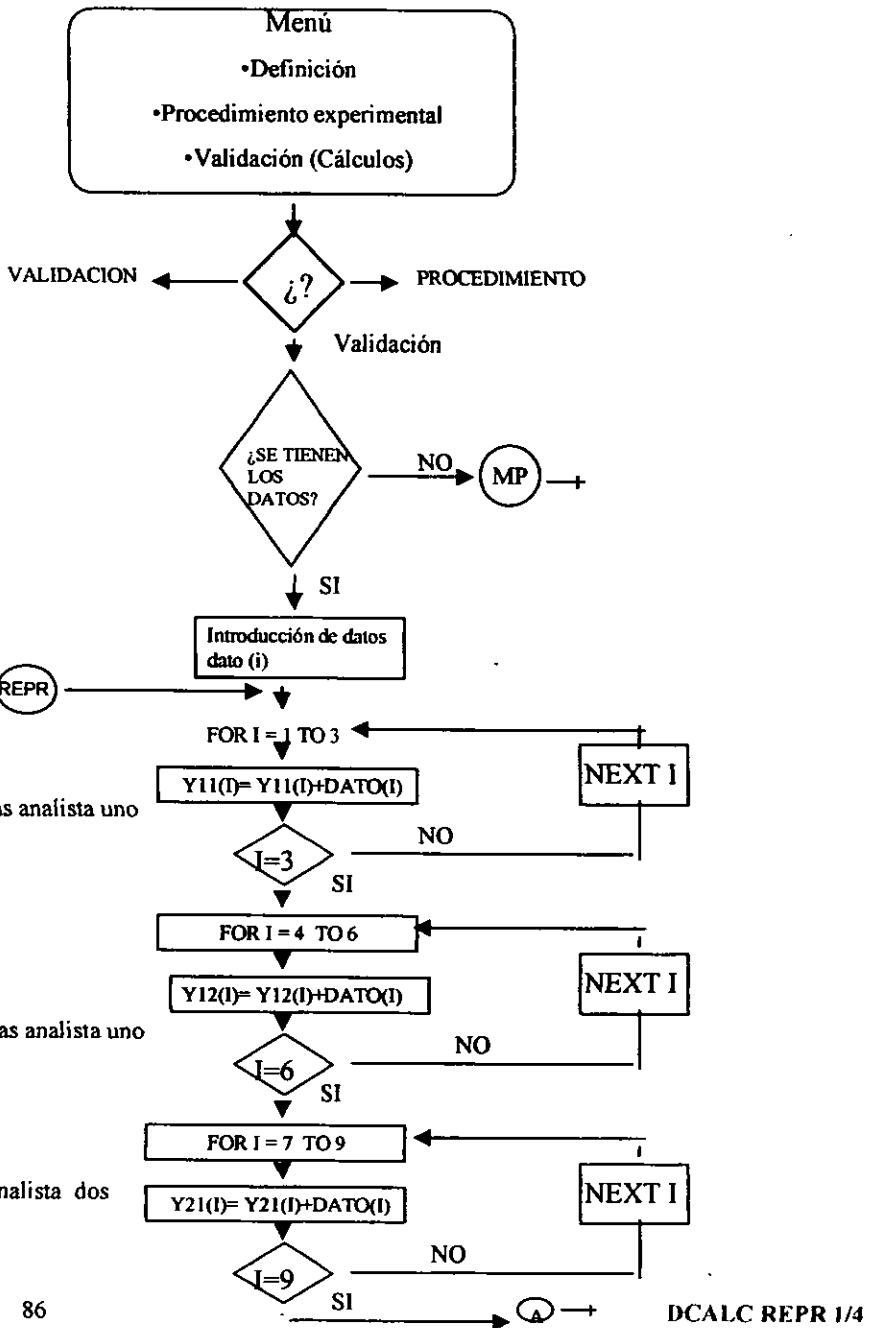
REX

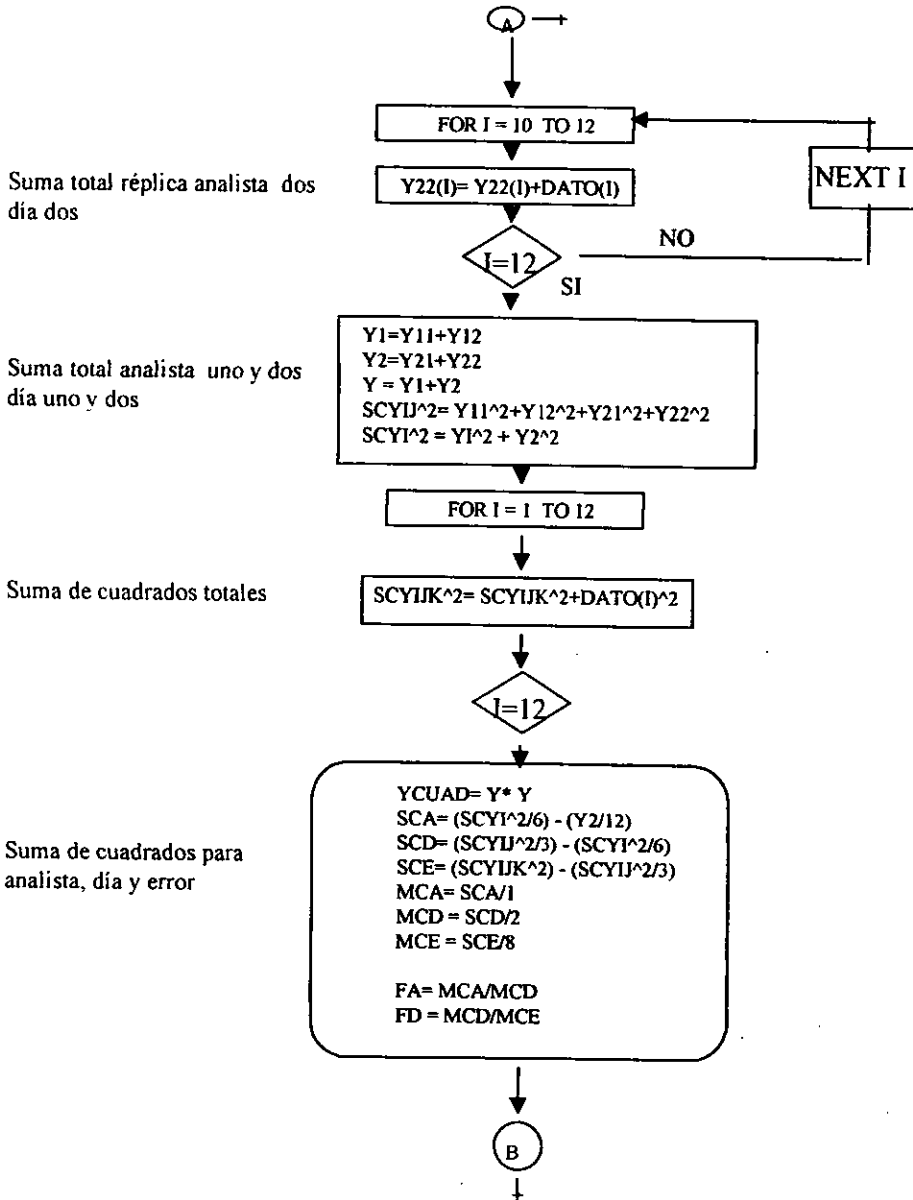




Cálculo de desviación estándar

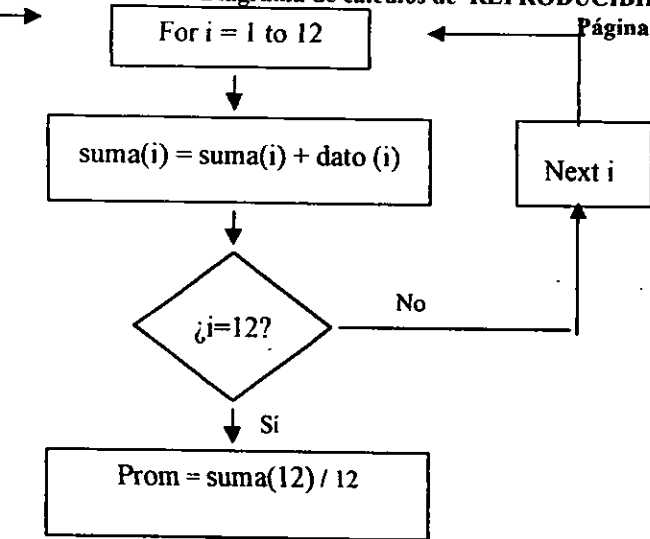
Cálculo de coeficiente de variación



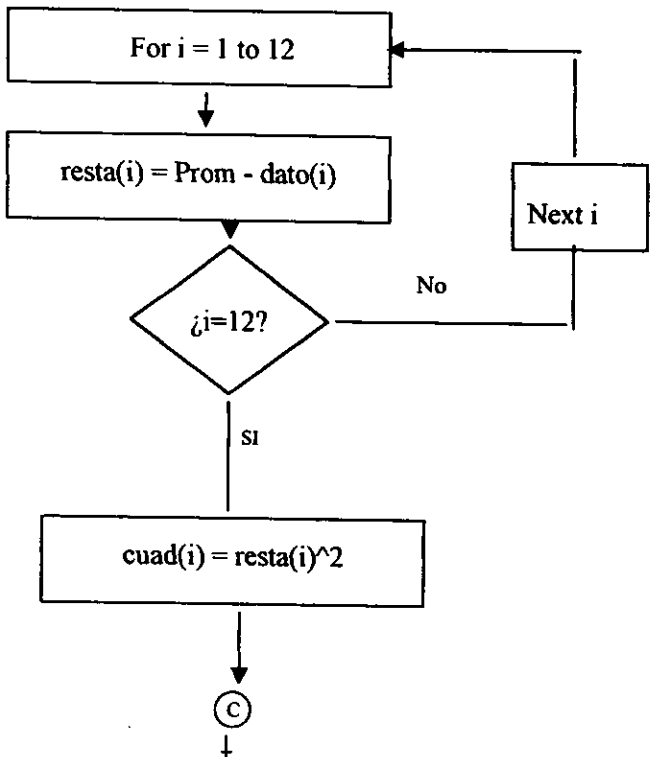




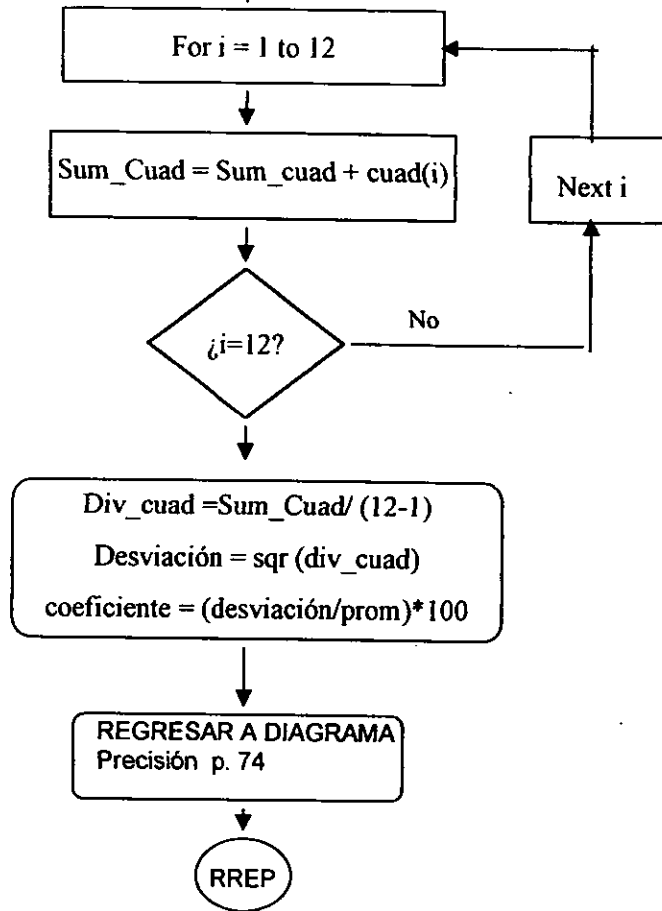
Cálculo de promedio de datos



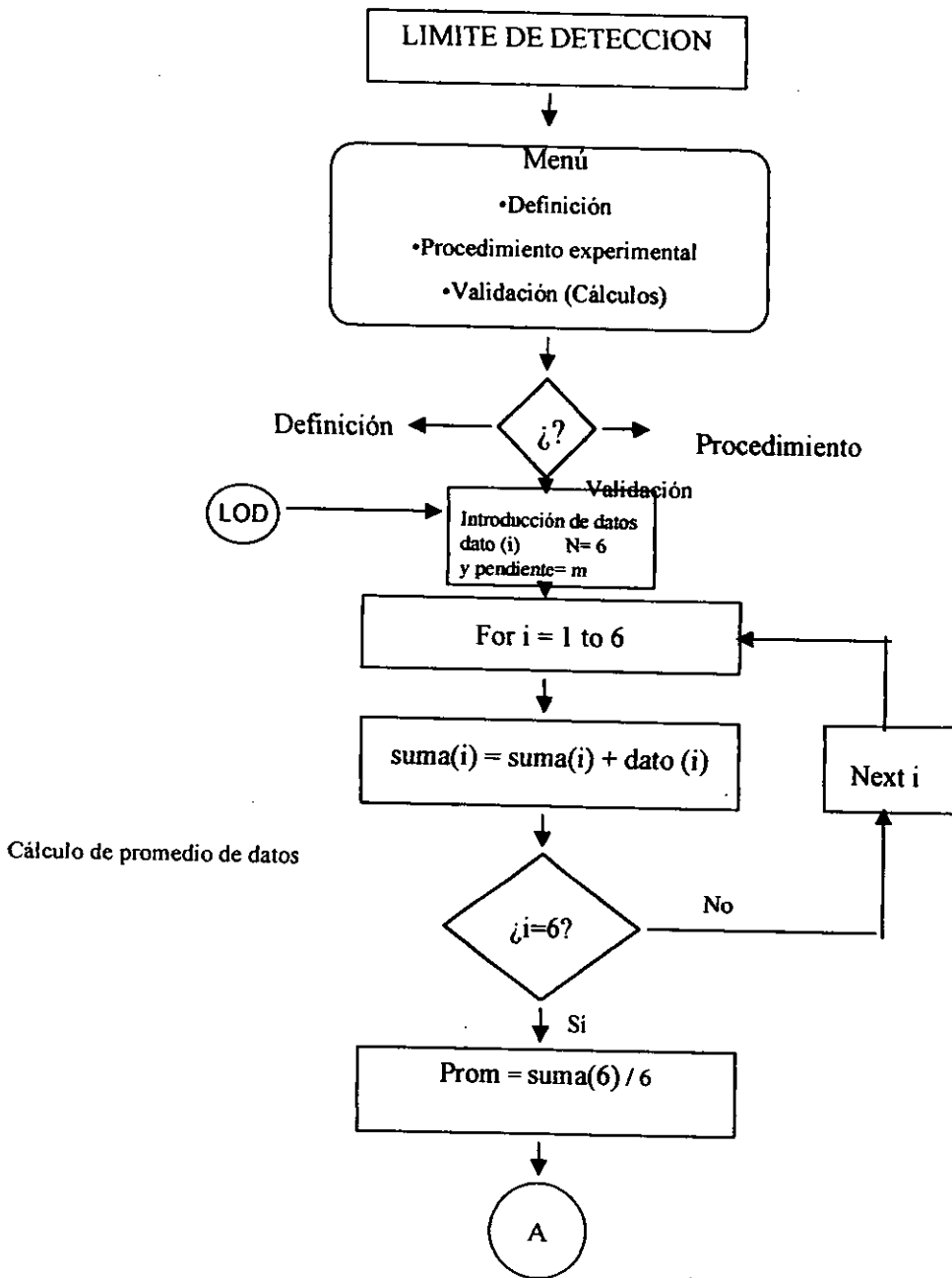
Cálculo de desviación estándar

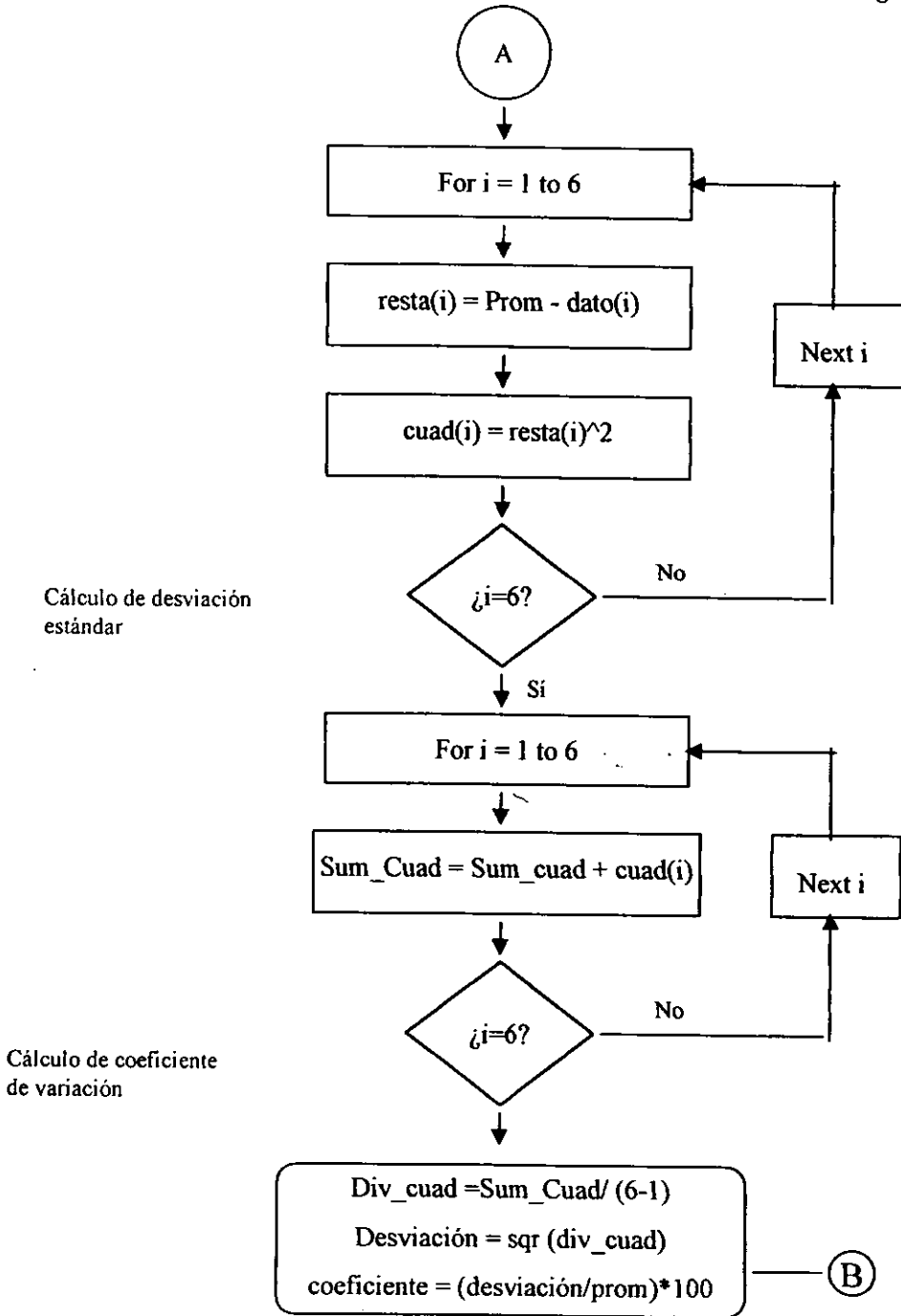


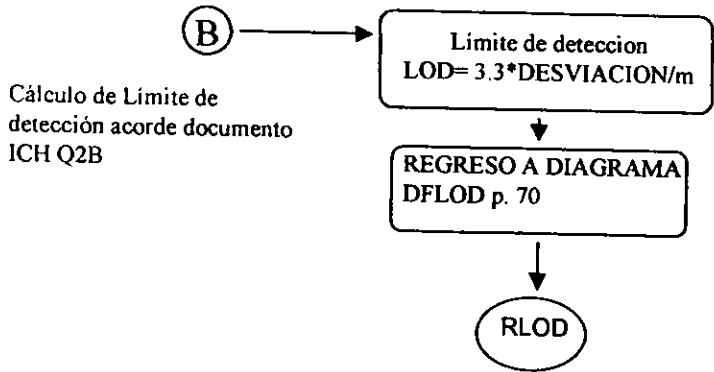
Ⓢ

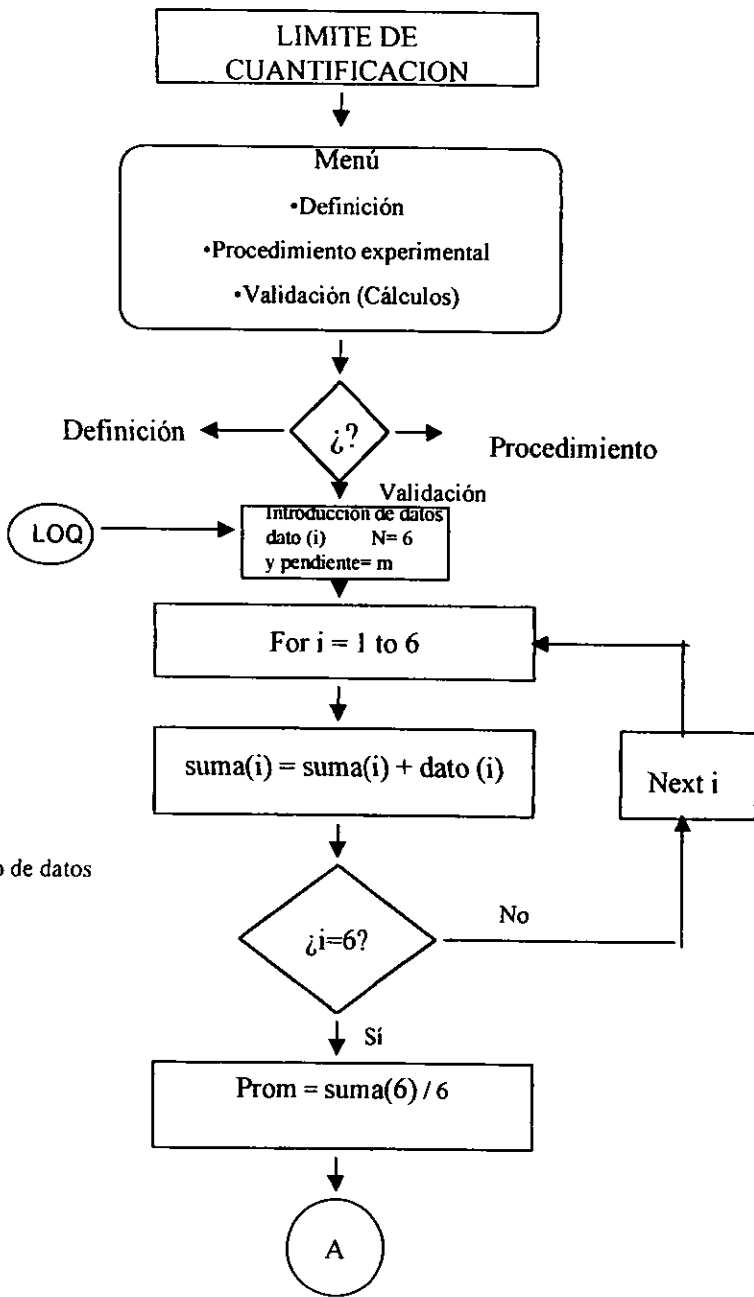


Cálculo de coeficiente de variación









Cálculo de promedio de datos

Cálculo de desviación estándar

Cálculo de coeficiente de variación

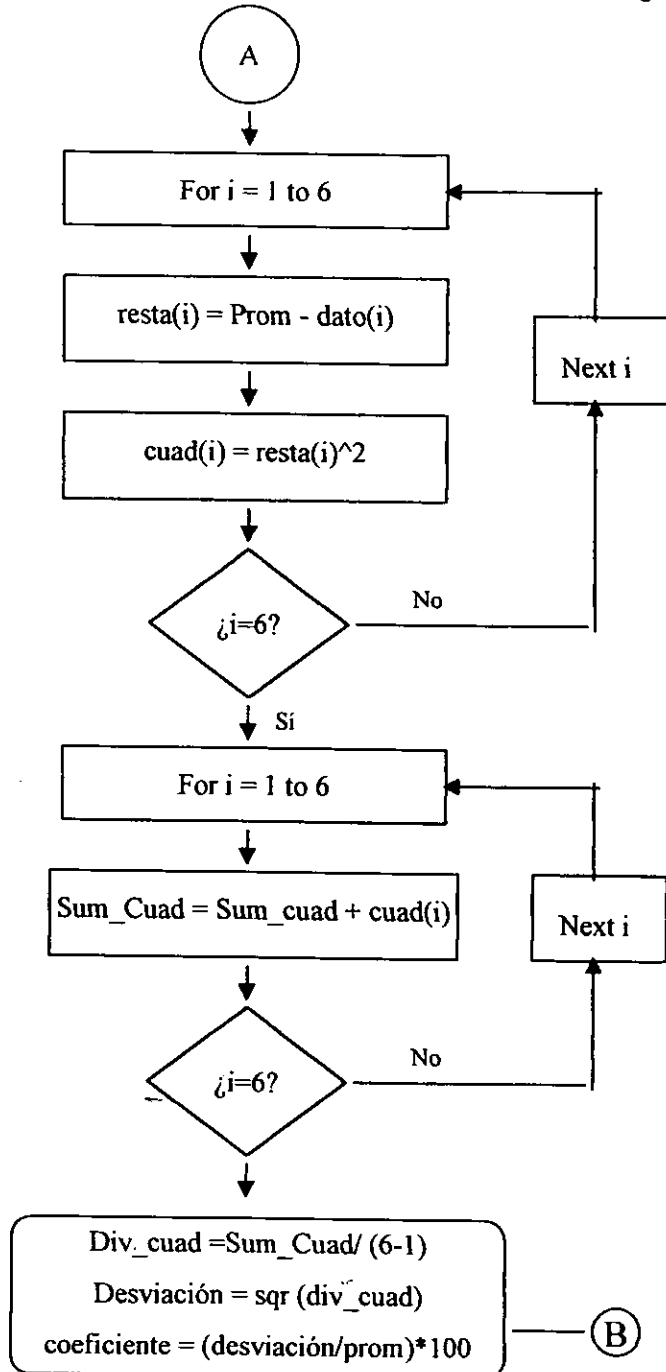
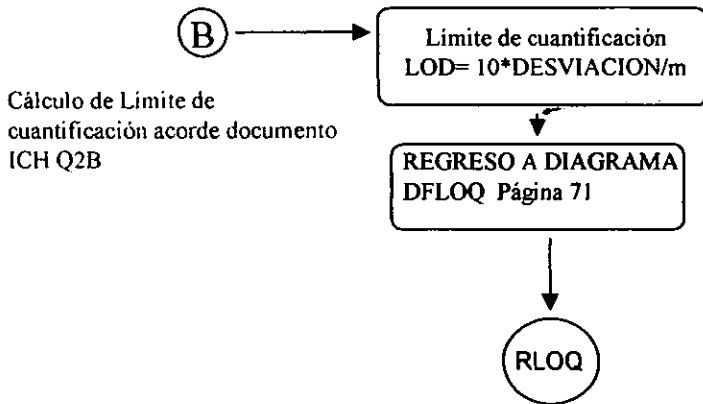
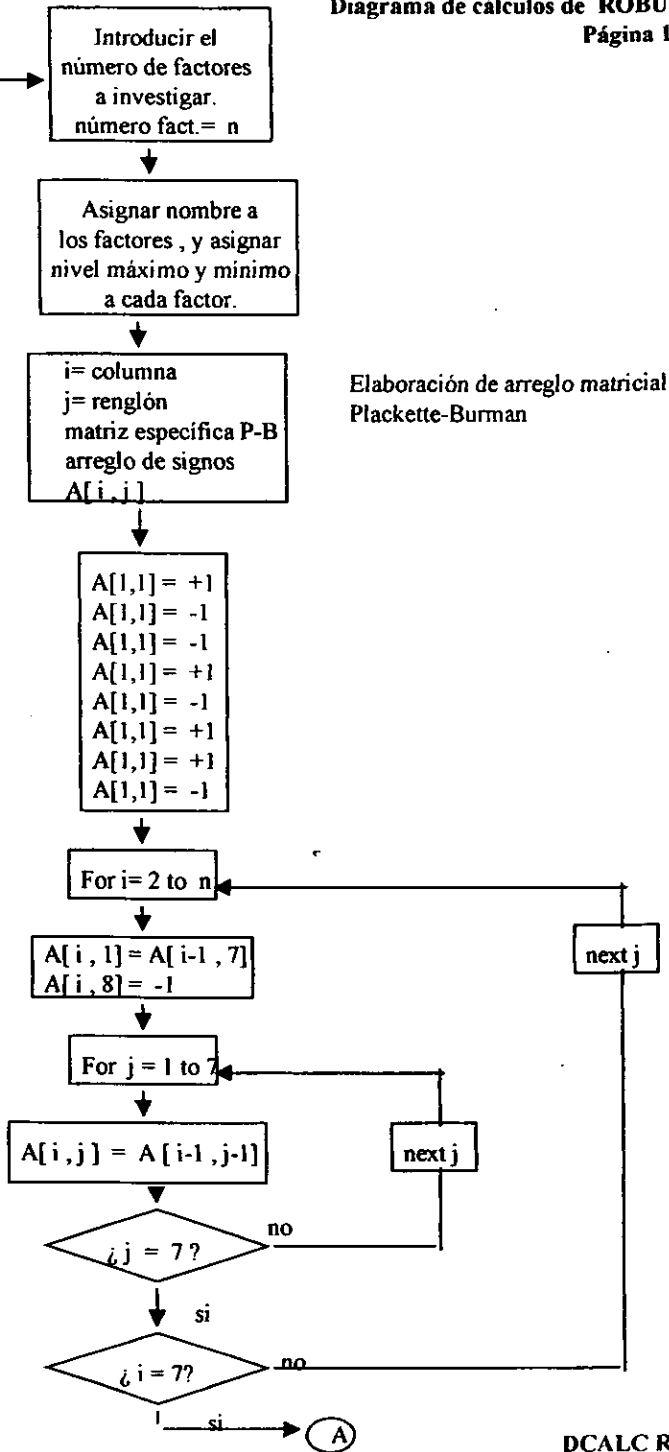


Diagrama de cálculos de Límite de cuantificación
Página 2 de 3

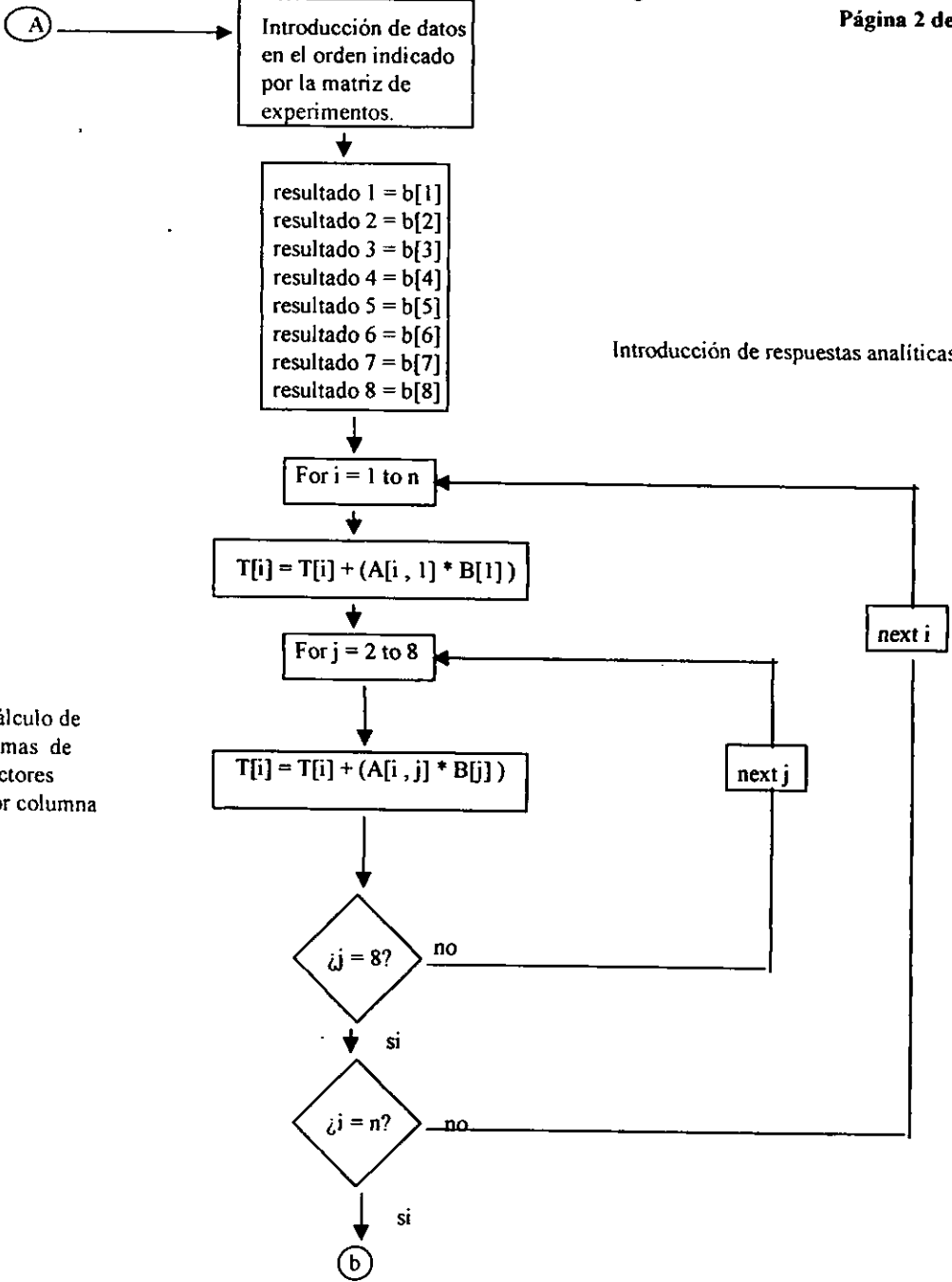


ENSAYO DE ROBUSTEZ.

ROB



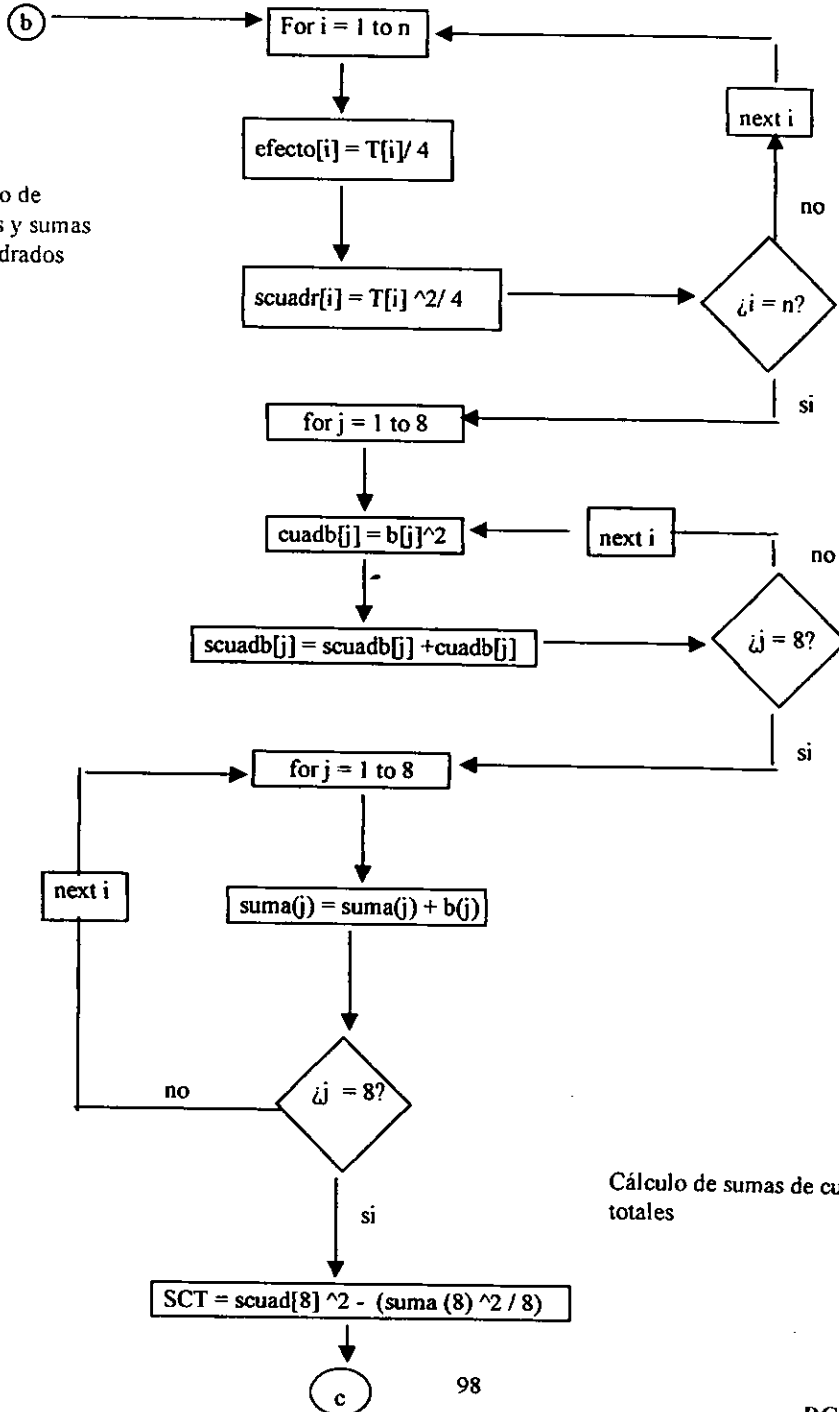
Elaboración de arreglo matricial
 Plackette-Burman



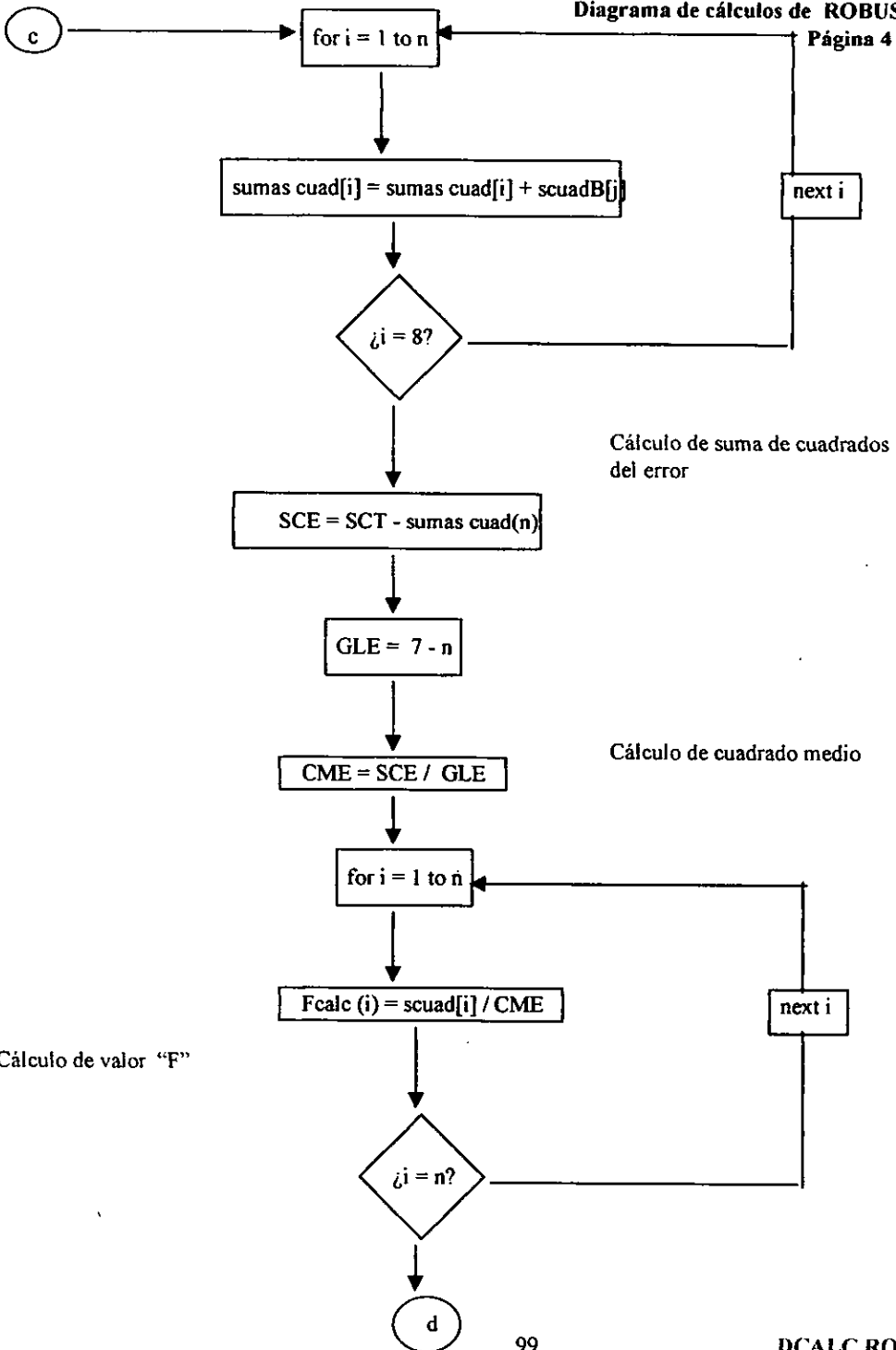
Cálculo de sumas de factores por columna

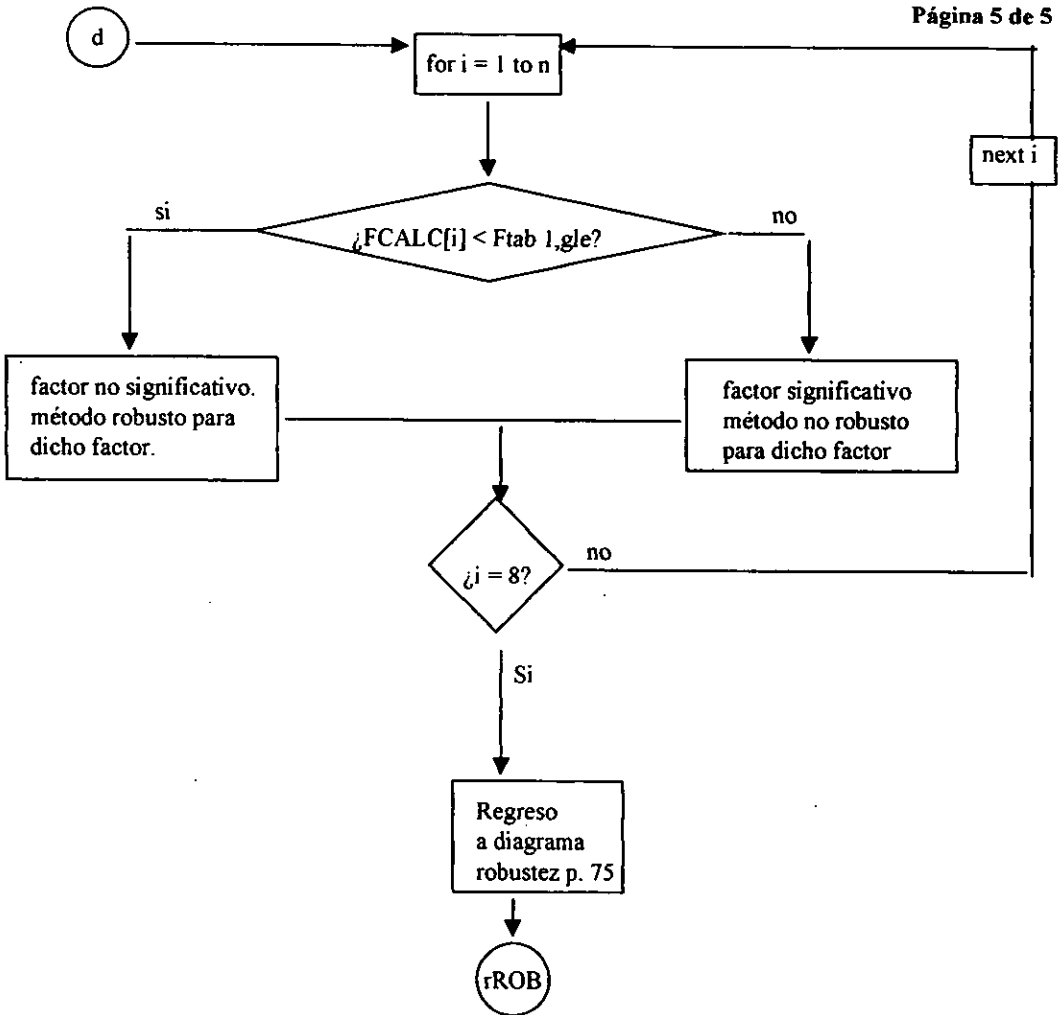
Introducción de respuestas analíticas

Cálculo de efectos y sumas de cuadrados



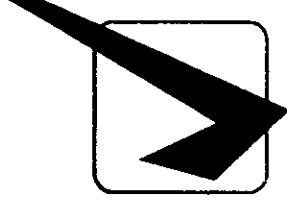
Cálculo de sumas de cuadrados totales





Anexo 2.

Validación del algoritmo



ANEXO 2. Resultados de la validación del algoritmo.

4.2 Validación del algoritmo

4.2.1 Casos de estudio

4.2.1.1 Método para identificación de naproxén sódico en tabletas por espectroscopía infrarroja*

PASO NO.	Información de entrada Usuario	Información del algoritmo		
		información requerida	información de salida	Localización en el algoritmo
1	Método para identificación de naproxén sódico en tabletas por espectroscopía infrarroja.	¿En que categoría se encuentra el método analítico? Métodos para evaluación de identidad Métodos para cuantificación de p. activo o componente principal Pruebas límite de impurezas Determinación cuantitativa de impurezas Determinación de características de desempeño Ensayos en los que está implicada una matriz biológica.		DF PPAL p. 54
2	Opción elegida: Métodos analíticos para ensayos de identidad.		Características de calidad que deben ensayarse: Especificidad, y robustez	DFPPAL OPCION I p. 54
3		iniciar con el proceso de validación salida	Usted desea :	DFPPAL p. 55

PASO NO.	Información del algoritmo		
	Información de entrada Usuario	información requerida	información de salida
4	Opción elegida : Iniciar Proceso de validación.	Inicio del proceso de validación : prueba : ESPECIFICIDAD. Elegir opción : Definición, procedimiento experimental, validación o salida	Localización en el algoritmo DFPPAL p. 55 DFESP p. 66
5	Opción elegida: procedimiento experimental		Se deben llevar a cabo el ensayo de identidad en: análito de interés, excipientes productos de degradación o sustancias relacionadas que puedan estar presentes en la muestra análito de interés+productos de degradación. REGRESO A MENU ANTERIOR
6		Inicio del proceso de validación : especificidad. Elegir opción : Definición, procedimiento experimental, validación o salida	DFESP ESP3.1 p. 66
7	Opción elegida: Validación (proceso de datos y cálculos)		DFESP ESP 3.1 p.66
8		El parámetro siguiente es ROBUSTEZ. ¿Desea continuar el proceso de validación? S/N	En esta prueba no aplica el análisis estadístico, por lo que únicamente se debe reunir la información (espectros) en donde se indique ausencia de interferencia entre el análisis de interés y los demás componentes. CONTINUAR PROCESO DE VALIDACION
9	Opción elegida: Continuar el proceso de validación	Robustez elegir opción: Definición, procedimiento experimental, validación o salida	DFPPAL CONECTOR C1 p. 56 DF ROBUS CONECTOR ROB P. 56

Información del algoritmo		información requerida	información de salida	Localización en el algoritmo
PASO NO.	Información de entrada Usuario			
10	Opción elegida: procedimiento experimental		Se deben seleccionar los factores que bajo una variedad de circunstancias podrían modificar la respuesta analítica. El número de factores para realizar una corrida de 8 experimentos es entre 3 y 7. Realizar los experimentos acorde al arreglo factorial Plackette Burman en orden aleatorio. Calcular efectos, y por medio de un análisis de varianza, comprobar la significancia de éstos sobre la respuesta. REGRESAR A MENU ANTERIOR	DF ROBUS OPCIÓN ROB1 Y ROB2 p. 75
11		Robustez elegir opción: Definición, procedimiento experimental, validación o salida		DFROBUS CONECTOR ROB p. 75
12	Opción elegida: SALIDA			DF ROBUS OPCION ROB4 p. 75

4.2.1.2 Método para cuantificación de sulfametazina sódica en materia prima por HPLC²⁸

PASO NO.	Información del algoritmo			Localización en el diagrama de flujo
	Información de entrada Usuario	información requerida	información de salida	
1	Método analítico utilizado para cuantificación de sulfametazina sódica en materia prima.	¿En qué categoría se encuentra el método analítico? Métodos para evaluación de identidad Métodos para cuantificación de p. activo o componente principal Pruebas límite de impurezas Determinación cuantitativa de impurezas Determinación de características de desempeño Ensayos en los que está implicada una matriz biológica.		DF PPAL p. 54
2	Métodos para cuantificación de p. activo o componente principal en la formulación.		Características de calidad de deben ensayarse: Especificidad, Linealidad, Exactitud, Precisión, Robustez.	DFPPAL Opción II p. 54
3		Usted desea : Iniciar con el proceso de validación salida		DFPPAL p. 55
4	Opción elegida : Inicio del proceso de validación.	Inicio del proceso de validación : Prueba. ESPECIFICIDAD. Elegir opción : Definición, procedimiento experimental, validación o salida		DFPPAL Conectores II , ESP p. 55 y DFESP p. 66

Información del algoritmo			
PASO NO.	Información de entrada Usuario	información requerida	información de salida Localización en el diagrama de flujo
5	Opción elegida: procedimiento experimental		DF ESP SECCION ESP2 p. 66 Se debe llevar a cabo el ensayo de identidad en: analito de interés, productos de degradación o sustancias relacionadas que puedan estar presentes en la muestra analito de interés+productos de degradación. REGRESO A MENU ANTERIOR
6		Inicio del proceso de validación : Especificidad. Elegir opción : Definición, procedimiento experimental, validación o salida	DFESP ESP3.1 p. 66
7	Opción elegida: Validación (proceso de datos y cálculos)		DFESP ESP 3.1 p. 66 En esta prueba no aplica el análisis estadístico, por lo que únicamente se debe reunir la información (espectros, cromatogramas, etc) en donde se indique ausencia de interferencia entre el analito de interés y los demás componentes.
8		El parámetro siguiente es Linealidad. ¿Desea continuar el proceso de validación? S/N	DF PPAL CONECTORES C1 Y LIN p. 56
9	Opción elegida: Continuar el proceso de validación	LINEARIDAD, elegir opción: Definición, procedimiento experimental, validación o salida	DFLINEAR CONECTOR LIN p. 67

Información del algoritmo				
PASO NO.	Información de entrada Usuario	información requerida	información de salida	
			Localización en el diagrama de flujo	
10	Opción elegida: procedimiento experimental		Linealidad del sistema: Se deben preparar una serie de estándares que contengan al menos cinco diferentes concentraciones de analito igualmente espaciados y considerando un rango de concentraciones desde 50 hasta 150%. Utilizar al menos 3 réplicas por concentración. Linealidad del método: Se deben preparar una serie de muestras con diferentes concentraciones de analito que contengan los mismos componentes de la matriz en la que se encuentra la muestra problema (placebos añadidos). Preparar al menos cinco diferentes concentraciones de analito igualmente espaciado, y al menos tres réplicas, por cada concentración. Aplicar el método propuesto y medir la respuesta analítica. REGRESO AL MENU ANTERIOR	DLINEAR 1/1 SECCION LIN2 p. 67
11		LINEARIDAD, elegir opción: Definición, procedimiento experimental, validación o salida		DLINEAR conector LIN p. 67
12	Opción elegida: Proceso de validación. (proceso de datos y cálculos) Respuesta : Si.	LINEARIDAD DEL SISTEMA. ¿Se tienen los resultados analíticos de la prueba? S/N		DLINEAR OPCIÓN LIN 3.1 p. 67
13		Introducir número de datos de concentración = V1 Introducir número de réplicas= V2		DCALC LIN p.76

PASO NO.	Información de entrada		Información del algoritmo	
	Usuario		información requerida	información de salida
14	Introducción de datos por el usuario V1 = 5 V2 = 6		Introducir resultados analíticos en la matriz de resultados V1~V2	Localización en el diagrama de flujo DCALC LIN 1/ 5 p.76

15.- Introducción de resultados analíticos por el usuario

	conc.1	conc.2	conc.3	conc.4	conc.5
(Asmz/Ast)* Csmz*	50.1	100.1	150.2	180.2	200.2
replica 1	59.57	117.56	176.79	210.45	238.16
replica2	57.81	118.49	179.09	211.24	238.85
replica3	58.96	117.98	176.59	210.67	239.28
replica 4	57.32	116.51	176.66	211.01	239.34
réplica 5	57.99	116.81	178.92	211.33	239.90
réplica 6	58.16	117.25	176.41	210.03	238.19

* La respuesta se reporta como Area de sulfametazina sódica/ Area del estándar interno * concentración del estándar

PASO NO.	Información de entrada Usuario	Información del algoritmo	Información de salida
16		<p>información requerida</p>	<p>fórmulas utilizadas por el algoritmo:</p> <p>promedio $\bar{x} = \frac{\sum x_i}{v2}$</p> <p>desviación estándar $s = \frac{\sqrt{(\bar{x} - x_i)^2}}{v2 - 1}$</p> <p>desv. est. relativa $der = s / \bar{X} * 100$</p> <p>pendiente: $b = \frac{[\sum y * \sum y^2] - [\sum y * \sum xy]}{[(v1 * \sum x^2)] - [(\sum x)^2]}$</p> <p>ordenada $a = \frac{(v1 * \sum xy) - [\sum x * \sum y]}{(v1 * \sum x^2) - [(\sum x)^2]}$</p>

Información de entrada		Información del algoritmo	
PASO NO.	Usuario	información requerida	Localización
17		Resultados obtenidos por el algoritmo : ordenada al origen = -0.999 pendiente = 1.18 coeficiente de correlación = 0.9999 coeficiente de determinación = 0.9999	DCALC LIN Conector RLIN p. 80
18		Decisión ¿ 0.98 < r ² < 1.02 ? ; respuesta si.	DFLINEAR Conector RLI p. 67
19		El sistema es lineal	DFLINEAR 1/1 p. 67
20		El parámetro que sigue es Linealidad del método. Usted desea : Continuar el proceso de validación Salir	DFLINEAR 1/1 OPCION LIN M p. 67
21	Opción elegida : Continuar el proceso de validación.	¿Se tienen los datos ?	DFLINEAR OPCION LIN 3.2 p.68
22	Respuesta : SI.	Introducir número de datos de concentración = V1 Introducir número de réplicas= V2	DFLINEAR OPCION LIN 3.2 p.68 Y DCALC LIN p. 76
23	Introducción de datos por el usuario V1 = 5 V2 = 3	Introducir resultados analíticos en la matriz de resultados V1*V2	DCALC LIN p. 76

24 Introducción de resultados analíticos por el usuario

	cant. Adic.1 mg	cant. Adic.2 mg	cant. Adic.3 mg	cant. Adic.4 mg	cant. Adic.5 mg
(Asmz/Ast)* Csmz*	102.87	108.95	115.02	121.02	127.10
replica 1	102.98	108.34	114.68	121.86	127.24
replica 2	101.78	107.47	115.03	122.24	126.8
replica 3	104.77	107.39	114.52	122.03	126.77

PASO NO.	Información de entrada	Información del algoritmo	
	Usuario	información requerida	información de salida
25			fórmulas utilizadas por el algoritmo: promedio $\bar{x} = \frac{\sum x_i}{v2}$ desviación estándar $s = \frac{\sqrt{(\bar{x} - x_i)^2}}{v2 - 1}$

* La respuesta se reporta como Área de sulfametazina sódica/ Área del estándar interno * concentración del estándar

PASO NO.	Información de entrada Usuario	Información del algoritmo	
		desv. est. relativa $der = s / \bar{x} * 100$ pendiente: $h = \frac{[\sum y * \sum y^2] - [\sum y * \sum xy]}{[(\sum x * \sum x^2)] - [(\sum x)^2]}$ ordenada: $a = \frac{(n * \sum xy) - [\sum x * \sum y]}{(n * \sum x^2) - [(\sum x)^2]}$	
26		Resultados obtenidos por el algoritmo: ordenada al origen = -4.78 pendiente = 1.0421 coeficiente de correlación = 0.994 coeficiente de determinación = 0.9881	DCALCLIN SECCION RLIN p. 80
27		Decisión ¿ 0.98 < 1.02 ? : respuesta si.	DFLINEAR RLI p. 68
28		El método es lineal	
29	El parámetro con el que se debe continuar es EXACTITUD. Usted desea : Continuar el proceso de validación Salida		DFPPAL OPCION II C2 EXA p.56
30	Opción elegida : Continuar con el proceso de validación	EXACTITUD. Usted desea ir a : Procedimiento experimental Proceso de Validación (cálculos y resultados) Salida.	DFEXAC OPCION EX2 p. 69

Información de entrada		Información del algoritmo		
PASO NO.	Usuario			
31	Opción elegida: procedimiento experimental		Preparar independientemente una serie de muestras con el menos 3 puntos de concentración en el rango de 50 al 150% de la concentración especificada en el rango de trabajo. Preparar 3 réplicas por concentración. La muestra debe estar preparada en la matriz donde originalmente se encuentra la muestra problema (placebos añadidos.) Aplicar el método de trabajo de forma independiente para cada muestra. REGRESAR AL MENU ANTERIOR	DFEXAC OPCION EX2 p. 69
32		EXACTITUD. Usted desea ir a: Procedimiento experimental Proceso de Validación (cálculos y resultados) Salida.		DFEXAC EX2 p. 69
33	Opción elegida: Proceso de validación (cálculos y resultados) Respuesta: Si	¿Se tienen los datos?		DFEXAC OPCION EX3 p. 69
34		Introducir número de datos de concentración = V1 Introducir número de réplicas = V2		DCALC EXA CONECTOR EX p. 81
35	Introducción de datos V1 = 3 V2 = 6	Introducir resultados analíticos en la matriz V1*V2		DCALC EXA CONECTOR A p. 81

36 Introducción de datos por el usuario

Cantidad adicionada mg	Cantidad recuperada	% Recuperado	Nivel de concentración
120.96	121.28	100.27	105%
120.99	120.97	99.99	
120.99	121.61	100.52	
120.97	121.12	100.13	
120.98	120.82	99.88	100%
121.04	120.76	99.77	
114.96	115.54	100.51	
114.96	115.58	100.54	
114.94	114.85	99.93	95%
114.94	116.59	101.44	
114.96	114.92	99.98	
114.99	115.00	100.01	
108.90	108.46	99.60	100%
108.89	108.98	100.09	
108.90	108.84	99.95	
108.92	108.39	99.52	
108.88	109.76	100.81	
108.91	108.82	99.93	

PASO NO.	información de entrada	información del algoritmo
	información requerida	información de salida
37		<p>fórmulas utilizadas por el algoritmo:</p> <p>promedio $\bar{x} = \frac{\sum x_i}{v_2}$</p> <p>desviación estándar $s = \frac{\sqrt{(\bar{x} - x_i)^2}}{v_2 - 1}$</p> <p>desv. est. relativa $der = s / \bar{X} * 100$</p> <p>pendiente: $b = \frac{[\sum y * \sum y^2] - [\sum y * \sum xy]}{[v_1 * \sum x^2] - [(\sum x)^2]}$</p> <p>ordenada: $a = \frac{(v_1 * \sum xy) - [\sum x * \sum y]}{(v_1 * \sum x^2) - [(\sum x)^2]}$</p>

Información de entrada		Información del algoritmo		
PASO NO.	Usuario	información requerida	información de salida	Localización
38			Resultados obtenidos por el algoritmo : Nivel de concentración 105% : promedio:100.09%, desv. est. 0.35, DER: 0.35% Nivel de concentración 100% : Promedio: 100.38% desv. est: 0.55, DER:0.55% Nivel de concentración 95% : promedio: 99.98% desv. est: 0.45, DER: 0.45% Nota : Resultados reportados en porcentaje de recuperación.	DCALC EXA CONECTOR REX p. 83
39			Decisión ¿ porcentaje de recuperación entre 98 y 102% ? ; Y ¿ Coeficiente de variación menor a 2.0% ? respuesta : si	DFEXA CONECTOR REX p.89
40			El método es EXACTO	
41		El parámetro siguiente es Precisión ¿Desea continuar el proceso de validación? S/N		DFPPAL SECCION II CONECTOR PREC. p. 56
42	Opción elegida: Continuar el proceso de validación	Precisión, elegir opción: Definición, procedimiento experimental, validación o salida		DF PREC p. 72

Información del algoritmo		
Información de entrada	Información de salida	
Usuario	Localización	
<p>43</p> <p>Opción elegida: procedimiento experimental</p>	<p>PRECISION DEL SISTEMA (repetibilidad) : Se debe realizar por sextuplicado la lectura de respuesta de una misma solución estándar que contiene la concentración al 100% especificado. Registrar los resultados.</p> <p>PRECISION DEL MÉTODO: Se debe preparar por sextuplicado una muestra que contenga el analito de interés en una concentración equivalente al 100% (estándar) adicionado a la matriz en la cual se encuentra la muestra problema. Aplicar el método en cuestión independientemente para cada muestra y registrar los resultados.</p> <p>PRECISIÓN INTERMEDIA: Dos analistas en dos diferentes días deben analizar independientemente tres réplicas de placebo añadidos con el analito de interés en una concentración equivalente al 100%</p>	<p>DFPREC OPCION PREC 2. p. 73</p>
<p>44</p>	<p>DFPREC CONECTOR PRECISION p. 72</p>	
<p>Información requerida</p>	<p>Precisión, elegir opción: Definición, procedimiento experimental, validación o salida</p>	

PASO NO.	Información del algoritmo		
	Información de entrada	información requerida	Información de salida
	Usuario		Localización
45	Opción elegida: Proceso de Validación (datos y cálculos)	PRECISION DEL SISTEMA (REPETIBILIDAD). ¿Se tienen los datos ?	DFPREC OPCION PREC 33.1 p. 72
46	Respuesta: Si	Introducción de resultados analíticos = dato (i)	DCALCREP p. 84 CONECTOR REP
47	Introducción de resultados por el usuario : Concentración 180.2 µg/ml Respuestas (área): 210.45 211.24 210.67 211.01 211.33 210.03		fórmulas utilizadas por el algoritmo: promedio $\bar{x} = \frac{\sum x_i}{v2}$ desviación estándar $s = \frac{\sqrt{(\bar{x} - x_i)^2}}{v2 - 1}$ desv.est.relativa der = s / \bar{X} * 100
48			DCALCREP CONECTOR RREP p. 85
49			DFPREC RREP p. 72
			DFPREC RREP. p. 72

PASO NO.	Información de entrada	Información del algoritmo		
		información requerida	Información de salida	Localización
50	Usuario	El parámetro con el que se debe continuar la validación es precisión del método. Usted desea : Continuar el proceso de validación Salir		DFPREC CONECTOR PRM p. 72
51	Opción elegida: Continuar el proceso de validación	PRECISION DEL MÉTODO. ¿Satisfecho los datos ?		DFPREC CONECTOR PRM p. 73
52	Respuesta : Si	Introducir resultados analíticos dato (i)		DCALCREP CONECTOR REP p. 84
53	Introducción de datos por el usuario : Nivel de concentración 100% %recuperado: 100.51 100.54 99.93 102.44 99.98 100.01		fórmulas utilizadas por el algoritmo: promedio $\bar{x} = \frac{\sum x_i}{v2}$ desviación estándar $s = \frac{\sqrt{(\bar{x} - x_i)^2}}{v2 - 1}$ desv.est. relativa der= $s/\bar{X} * 100$	DCALCREP p. 84 y 85
54			Resultados : promedio= 100.4 desviación estándar = 0.55 desviación estándar relativa : 0.55%	DCALCREP CONECTOR RREP p. 85
55			Decisión ¿ Desviación estándar relativa menor a 2.0% ? respuesta : si	DFPREC CONECTOR RREP p. 73

PASO NO.	Información del algoritmo	
	información requerida	información de salida
56		El método es preciso.
57	El parámetro que se debe evaluar a continuación es precisión intermedia o reproducibilidad. Usted desea: Continuar el proceso de validación Salir	DFPREC CONECTOR RREP p. 73 DFPREC OPCION PREC 3.3 p. 73
58	Opción elegida: Continuar el proceso de validación	
59	Respuesta : Si	REPRODUCIBILIDAD. ¿Se tienen los datos ? Introducir datos en la siguiente matriz de resultados : Y(i,j,k)
		DCALCREPR CONECTOR REPR p. 86 DCALCREPR p. 86

60.- Resultados analíticos introducidos por el usuario

Nivel de concentración 100%	día 1		día 2	
	% recuperado	% recuperado	% recuperado	% recuperado
analista 1	100.27	101.03	100.09	99.56
analista 2	99.98	101.48	99.93	100.44
	100.34	100.13		

PASO NO.	Información de entrada	Información del algoritmo	
	Usuario	información requerida	Información de salida
61			<p>Fórmulas utilizadas para el proceso de datos:</p> <p> $Y_{11} = y_{111} + y_{112} + y_{113}$ $Y_{12} = y_{121} + y_{122} + y_{123}$ $Y_{21} = y_{211} + y_{212} + y_{213}$ $Y_{22} = y_{221} + y_{222} + y_{223}$ $Y_{1..} = Y_{11} + Y_{12}$ $Y_{2..} = Y_{21} + Y_{22}$ $Y_{...} = Y_{1..} + Y_{2..}$ $\sum \sum Y_{ij}^2 = (Y_{11})^2 + (Y_{12})^2 + (Y_{21})^2 + (Y_{22})^2$ $SCE = \sum \sum \sum Y_{ijk}^2 - \frac{\sum \sum ij^2}{r}$ </p>

62 Resultados de salida proporcionados por el algoritmo

Fuente de variación	grados de libertad	sumas de cuadrados	cuadrado medio	Fcalc	Ftab.(glx/gle)
Analista	1	0.0833	0.083	0.149	$\alpha = 0.05$ 7.57
Día	2	0.507	0.253	0.455	6.06
Error	8	4.451	0.556		
Total	11	50.4			

Información del algoritmo				
PASO NO.	Información de entrada Usuario	información requerida	información de salida	Localización
63			<p>otros datos de salida promedio : 100.29 desviación estándar 0.67 desviación estándar relativa 0.67%</p>	<p>DCALC REPR CONECTOR RREPR p. 89</p>
64			<p>Decisión : $\Delta F_{calc}(\text{analista}) < F_{tab} 1.8, 0.05?$ respuesta : si EL METODO ES REPRODUCIBLE POR LOS ANALISTAS Decisión: $\Delta F_{calc}(\text{día}) < F_{tab} 2.8, 0.05 ?$ Respuesta: si EL METODO ES REPRODUCIBLE ENTRE DIAS</p>	<p>DF PREC CONECTOR RREPR p. 74</p>
65		<p>El parámetro con el que se debe continuar del proceso de validación es Robustez. Usted desea Continuar el proceso de validación Salir</p>		<p>DFPAL CONECTOR C6 p. 56</p>
66	<p>Opción elegida: Continuar el proceso de validación</p>	<p>Robustez, elegir opción: Definición, procedimiento experimental, validación o salida</p>		<p>DFROBUS OPCION ROB p. 75</p>

Información del algoritmo			
PASO NO.	Información de entrada Usuario	información requerida	Localización
67	Opción elegida: procedimiento experimental		DFROBUS OPCION ROB1 Y ROB2 p. 75
		Se deben seleccionar los factores que bajo una variedad de circunstancias podrían modificar la respuesta analítica. El número de factores para realizar una corrida de 8 experimentos es entre 3 y 7. Realizar los experimentos acorde al arreglo factorial Plackette Burman en orden aleatorio. Calcular efectos, y por medio de un análisis de varianza, comprobar la significancia de éstos sobre la respuesta.	
68		Robustez elegir opción: Definición, procedimiento experimental, validación o salida	DFROBUS 1/1 CONECTOR ROB p.75
69	Opción elegida: SALIDA		DFROBUS1/1 OPCION ROB4. p. 75

4.2.1.3 Método para cuantificación de impurezas orgánicas volátiles en sulfametoxazol materia prima para uso farmacéutico.

Información del algoritmo				
PASO NO.	Información de entrada: Usuario	información requerida	información de salida	Localización en el diagrama de flujo
1	Método analítico utilizado para cuantificación de impurezas orgánicas volátiles en sulfametoxazol materia prima	¿En que categoría se encuentra el método analítico? Métodos para evaluación de identidad Métodos para cuantificación de p. activo o componente principal Determinación cuantitativa de impurezas Pruebas límite de impurezas Determinación de características de desempeño Ensayos en los que está implicada una matriz biológica.		DF PPAL p. 54
2	Métodos para determinación cuantitativa de impurezas		Características de calidad que deben ensayarse: Especificidad, Linealidad, Exactitud, Límite de Cuantificación, Precisión y Robustez.	DFPPAL SECCION III p. 54
3		Usted desea : Iniciar con el proceso de validación salida		DFPPAL p. 55
4	Opción elegida : Inicio del proceso de validación.	Inicio del proceso de validación : Prueba. ESPECIFICIDAD. Elegir opción : Definición, procedimiento experimental, validación o salida		DFESP 1/1 p. 66

Información del algoritmo				
PASO NO.	Información de entrada Usuario	información requerida	información de salida	Localización en el diagrama de flujo
4	Opción elegida: procedimiento experimental		Se deben llevar a cabo el ensayo de Identidad en: análito de interés, impurezas conocidas, productos de degradación o sustancias relacionadas que puedan estar presentes en la muestra análito de interés+productos de degradación. REGRESO A MENU ANTERIOR	DF ESP SECCION ESP2, p. 66
6		Inicio del proceso de validación : Especificidad. Elegir opción : Definición, procedimiento experimental, validación o salida		DFESP ESP3.1 p. 66
7	Opción elegida: Validación (proceso de datos y cálculos)		En esta prueba no aplica el análisis estadístico, por lo que únicamente se debe reunir la información (espectros, cromatogramas, etc) en donde se indique ausencia de interferencia entre el análisis de interés y los demás componentes.	DFESP ESP 3.1 p. 66
8		El parámetro siguiente es Linealidad. ¿Desea continuar el proceso de validación? S/N		DF PPAL Conectores C1 y LIN p. 56
9	Opción elegida: Continuar el proceso de validación	LINEARIDAD, elegir opción: Definición, procedimiento experimental, validación o salida		DFLINEAR Conector LIN p. 67

Información del algoritmo				
PASO NO.	Información de entrada Usuario	Información requerida	Información de salida	Localización en el diagrama de flujo
10	Opción elegida: procedimiento experimental		<p>Linealidad del sistema: Se deben preparar una serie de estándares que contengan al menos cinco diferentes concentraciones de analito igualmente espaciados y considerando un rango de concentraciones desde 50 hasta 150%. Utilizar al menos tres réplicas por concentración.</p> <p>Linealidad del método: Se deben preparar una serie de muestras con concentraciones crecientes de analito que contengan los mismos componentes de la matriz en la que se encuentra la muestra problema (placebos añadidos). Preparar al menos cinco diferentes concentraciones de analito igualmente espaciado, y al menos tres réplicas. Por cada concentración. Aplicar el método propuesto y medir la respuesta analítica.</p> <p>REGRESO AL MENU ANTERIOR</p>	DFLINEAR Opción LIN2 p. 67
11		<p>LINEARIDAD, elegir opción: Definición, procedimiento experimental, validación o salida</p>		DFLINEAR Conector LIN p.67
12	Opción elegida: Proceso de validación. (proceso de datos y cálculos)	<p>LINEARIDAD DEL SISTEMA. ¿Se tienen los resultados analíticos de la prueba? S/N</p>		DFLINEAR OPCIÓN LIN 3.1 p. 67
13	Respuesta : Si.	<p>Introducir número de datos de concentración = V1 Introducir número de réplicas= V2</p>		DCALC LIN p. 76

PASO NO.	Información de entrada	Información del algoritmo		Localización en el diagrama de flujo
	Usuario	Información requerida	Información de salida	
14	Introducción de datos por el usuario V1 = 5 V2 = 4	Introducir resultados analíticos en la matriz de resultados V1*V2		DCALC LIN p.76

15.- Introducción de resultados analíticos por el usuario

	conc.1 µg/ml	conc.2 µg/ml	conc.3 µg/ml	conc.4 µg/ml	conc.5 µg/ml
Ast/Ast1*	1.20	1.59	1.99	2.39	2.79
replica 1	0.2412	0.3538	0.4146	0.5402	0.6386
replica2	0.2619	0.3611	0.4576	0.5483	0.6440
replica3	0.2707	0.3660	0.4557	0.5406	0.5735
replica 4	0.2747	0.3600	0.4398	0.5456	0.6297

* La respuesta analítica está reportada como Área del estándar/Área del estándar interno.

PASO NO.	Información de entrada	Información requerida	Información del algoritmo
16	Usuario		<p>Información de salida</p> <p>fórmulas utilizadas por el algoritmo:</p> <p>promedio $\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n}$</p> <p>desviación estándar $s = \frac{\sqrt{(\bar{x} - x_i)^2}}{\sqrt{n-1}}$</p> <p>desv. est. relativa $der = s / \bar{x} * 100$</p> <p>pendiente: $b = \frac{[\sum y * \sum y^2] - [\sum y * \sum xy]}{[(\sum x^2)] - [(\sum x)^2]}$</p> <p>ordenada: $a = \frac{(\sum xy) - [\sum x * \sum y]}{(\sum x^2) - [(\sum x)^2]}$</p>

PASO NO	Información de entrada Usuario	Información requerida	Información del algoritmo	Localización en el diagrama de flujo
17			Resultados obtenidos por el algoritmo : ordenada al origen = -0.0052 pendiente = 0.2284 coeficiente de correlación = 0.9914 coeficiente de determinación = 0.9848 Decisión ¿ $0.98 < r^2 < 1.02$? ; respuesta SI.	DCALC LIN CONECTOR RLIN p. 80
18			El sistema es lineal	DFLINEAR CONECTOR RLIN p. 87 DFLINEAR 1/1 p. 87
19			El parámetro que sigue es Linealidad del método. Usted desea : Continuar el proceso de validación Salir	DFLINEAR 1/1 OPCION LIN M p. 87
20	Opción elegida : Continuar el proceso de validación.	¿Se tienen los datos ?		DFLINEAR 1/1 OPCION LIN 3.1 p. 87
21	Respuesta : SI.	Introducir número de datos de concentración = V1 Introducir número de réplicas= V2 Número de valores de concentración entre 5 y 71 CONTINUAR PROCESO DE VALIDACION		DFLINEAR 1/1 OPCION LIN 3.2 Y DCALC LIN 1/5 DCALC LIN 1/5 p. 76
22	Introducción de datos por el usuario V1 = 3 V2 = 3			
23				

PASO NO.	Información de entrada	Información requerida	Información del algoritmo	
24	<p>Usuario</p> <p>El parámetro con el que se debe continuar es EXACTITUD. Usted desea : Continuar el proceso de validación Salida</p>	<p>Información requerida</p>	<p>Información de salida</p>	<p>Localización en el diagrama de flujo</p> <p>DFPPAL OPCION II C2 EXA p. 56</p>
25	<p>Opción elegida : Continuar con el proceso de validación</p>	<p>EXACTITUD Usted desea ir a : Procedimiento experimental Proceso de Validación (cálculos y resultados) o Salida.</p>		<p>DFEXAC OPCION EX2 p. 69</p>
26	<p>Opción elegida: procedimiento experimental</p>		<p>Preparar independientemente una serie de muestras con al menos 3 puntos de concentración en el rango de 50 al 150% de la concentración especificada en el rango de trabajo. Preparar 3 réplicas por concentración. La muestra debe estar preparada en la matriz donde originalmente se encuentra la muestra problema (placebos añadidos.). Aplicar el método de trabajo de forma independiente para cada muestra.</p>	<p>DFEXAC OPCION EX2 p. 69</p>
27		<p>EXACTITUD. Usted desea ir a: Procedimiento experimental Proceso de Validación (cálculos y resultados) ó Salida.</p> <p>¿Se tienen los datos?</p>	<p>REGRESAR AL MENU ANTERIOR</p>	<p>DFEXAC EX2 p. 69</p>
28	<p>Opción elegida: Proceso de Validación (cálculos y resultados)</p>	<p>Introducir número de datos de concentración = V1</p>		<p>DFEXAC OPCION EX3 p. 69</p>
29	<p>Respuesta: Si</p>	<p>Introducir número de réplicas = V2</p>		<p>DCALCEXA CONECTOR EX p. 61</p>

PASO NO.	Información de entrada	Información del algoritmo		
	Usuario	Información requerida	Información de salida	Localización en el diagrama de flujo
30	Introducción de datos V1 = 3 ; V2 = 5	Introducir resultados analíticos en la matriz V1~V2		DCALC EXA CONECTOR A p. 82

31 Introducción de datos por el usuario

Cantidad adicionada mg	Cantidad recuperada	% Recuperado	Nivel
1.5936	1.3868	87.02	
1.5936	1.4441	90.61	80%
1.5936	1.4281	89.61	
1.5936	1.4730	92.43	
1.5936	1.4951	93.81	
1.9920	1.8631	93.52	
1.9920	1.7849	89.60	
1.9920	1.7656	88.63	100%
1.9920	1.8225	91.48	
1.9920	1.7763	89.17	
2.3804	2.1014	87.90	
2.3804	2.0937	87.58	
2.3804	2.0772	86.89	
2.3804	2.1111	88.31	120%
2.3804	2.1921	91.70	

PASO NO.	Información de entrada	Información del algoritmo	Información de salida
	Usuario	Información requerida	fórmulas utilizadas por el algoritmo:
32			<p>promedio $\bar{x} = \frac{\sum xi}{v2}$</p> <p>desviación estándar $s = \frac{\sqrt{(\bar{x} - xi)^2}}{v2 - 1}$</p> <p>desv. est. relativa $der = \frac{s}{\bar{x}} * 100$</p> <p>pendiente: $b = \frac{[\sum y * \sum y^2] - [\sum y * \sum xy]}{[(v1 * \sum x^2)] - [(\sum x)^2]}$</p> <p>ordenada: $a = \frac{(v1 * \sum xy) - [\sum x * \sum y]}{(v1 * \sum x^2) - [(\sum x)^2]}$</p>

PASO NO.	información de entrada	información requerida	información del algoritmo	Localización en el diagrama de flujo
33	Usuario		<p>Resultados obtenidos por el algoritmo : promedios, desviación std, y desv. Est. relativa Nivel de concentración 80% : 90.70%, 2.6 y 2.88% Nivel de concentración 100% : 90.48% , 2.01 y 2.22% Nivel de concentración 120% : 88.46, 1.87, y 2.11% Nota : Resultados reportados en porcentaje de recuperación.</p>	DCALC EXA CONECTOR REX p. 83
34			Decisión ¿ porcentaje de recuperación entre 98 y 102% ? : Respuesta No	DFEXA CONECTOR REX p. 83
35			El método no es EXACTO	
36		El parámetro siguiente es Límite de Cuantificación ¿ Desea continuar el proceso de validación? S/N		DFPPAL conector C3 p.56

PASO NO.	Información de entrada Usuario	Información del algoritmo	Localización en el diagrama de flujo
37	Opción elegida: Procedimiento experimental	<p>Basado en la señal de ruido: Se debe comparar la respuesta de muestras de concentraciones conocidas muy bajas con la señal producida por muestras blanco. El límite de cuantificación aceptado es la muestra cuya concentración exhiba una señal diez veces mayor a la señal que produce la muestra blanco.</p> <p>B) Basado en la desviación estándar de la respuesta y la pendiente: El límite de cuantificación por este método puede ser expresado como: $LD = 10 \cdot (DES.V.STD)/m$; donde DESV STD es la desviación estándar de la respuesta obtenida por la lectura de 6 muestras blanco; y m es la pendiente de la curva de calibración.</p> <p>REGRESO AL MENU ANTERIOR</p>	DFLOQ OPCION LOQ1 Y LOQ2 p.71
37	Límite de Cuantificación, elegir opción: Definición, procedimiento experimental, validación, continuar con el parámetro siguiente, salida		DF LOQ CONECTOR LOQ p.71
38	Opción elegida: Continuar con el parámetro siguiente Nota: No se cuenta con los datos, ensayo no realizado	El parámetro siguiente es Precisión ¿Desea continuar el proceso de validación? S/N	DFPAL SECCION II CONECTOR PREC p. 56

PASO NO	Información de entrada Usuario	Información requerida	Información del algoritmo	Localización en el diagrama de flujo
39	Opción elegida: Continuar el proceso de validación	Precisión, elegir opción: Definición, procedimiento experimental, validación o salida		DF PREC p. 72
40	Opción elegida: procedimiento experimental		<p>PRECISION DEL SISTEMA (REPETIBILIDAD) : Se debe realizar por sextuplicado la lectura de respuesta de una misma solución estándar que contiene la concentración al 100% especificado. Registrar los resultados.</p> <p>PRECISION DEL MÉTODO (EVALUADA COMO REPETIBILIDAD): Se debe preparar por sextuplicado una muestra que contenga el análisis de interés (estándar) en una concentración equivalente al 100% adicionado a la matriz en la cual se encuentra la muestra problema. Aplicar el método en cuestión independientemente para cada muestra y registrar los resultados. PRECISION INTERMEDIA (REPRODUCIBILIDAD) : Dos análisis en dos diferentes días deben analizarse independientemente tres réplicas de plácebos añadidos con el análisis de interés en una concentración equivalente al 100%. Regresar al menú anterior</p>	DF PREC OPCION PREC 1 Y PREC 2, p. 72

PASO NO.	Información de entrada	Información del algoritmo		
	Usuario	Información requerida	Información de salida	Localización en el diagrama de flujo
41		Precisión, elegir opción: Definición, procedimiento experimental, validación , continuar con el parámetro siguiente o salida		DFPREC CONECTOR PRECISION p. 72
42	Opción elegida: Proceso de Validación	PRECISION DEL SISTEMA (REPETIBILIDAD). ¿Se tienen los datos ?		DFPREC OPCIÓN PREC3.1 p. 72 DCALCREP P. 84
43	Respuesta : si Introducción de resultados por el usuario :Concentración 1.63 µg/ml Respuestas (área) 124057 107314 117333 119331			
44			¡Número de datos no menor a 8! Elegir opción : reingresar datos Salir y continuar validación	DCALCREP P. 84
45	Opción elegida: Continuar Proceso de Validación	PRECISION DEL METODO. ¿Se tienen los datos ?		DFPREC OPCIÓN PREC3.1 p. 72 DCALCREP P. 84
46	Introducción de resultados por el usuario : Concentración 1.63 µg/ml Respuestas (µg/ml) 1.6250 1.6215 1.4175 1.3838		¡Número de datos no menor a 8! Elegir opción : reingresar datos, ó Salir y continuar validación	

PASO NO	Información de entrada Usuario	Información del algoritmo		
		Información requerida	Información de salida	Localización en el diagrama de flujo
47	Opción elegida: Salir y continuar validación.			
48		El parámetro con el que se debe continuar del proceso de validación es Reproducibilidad. ¿Se tienen los datos? Respuesta: NO Salir y Continuar		DFPREC p. 72
49		El parámetro con el que se debe continuar del proceso de validación es Robustez. Usted desea Continuar el proceso de validación Salir		DFPPAL CONECTOR C6 p. 56
50	Opción elegida: Continuar el proceso de validación	Robustez, elegir opción: Definición, procedimiento experimental, validación o salida		DF ROBUS CONECTOR ROB p.75
51	Opción elegida: procedimiento experimental		Se deben seleccionar los factores que bajo una variedad de circunstancias podrían modificar la respuesta analítica. El número de factores para realizar una corrida de 8 experimentos es entre 3 y 7. Realizar los experimentos acorde al arreglo matricial Plackette Burman en orden aleatorio. Calcular efectos, y por medio de un análisis de varianza, comprobar la significancia de éstos sobre la respuesta. REGRESAR A MENU ANTERIOR	DF ROBUS OPCIÓN ROB1 Y ROB2 p.75

PASO NO.	Información de entrada Usuario	Información del algoritmo		
		información requerida	información de salida	Localización en el diagrama de flujo
52		Robustez elegir opción: Definición, procedimiento experimental, validación o salida		DFROBUS CONECTOR ROB p.75
53	Opción elegida: SALIDA			DF ROBUS OPCION ROB4 p. 75

4.2.1.4 Método analítico para determinación de sulfametazina sódica en materia prima y plasma³¹

PASO NO	Información de entrada Usuario	Información requerida	Información de salida	Localización en el diagrama
1	Método analítico para la cuantificación de sulfametazina sódica en plasma.	¿En que categoría se encuentra el método analítico? Métodos para evaluación de identidad Métodos para cuantificación de p. activo o componente principal Determinación cuantitativa de impurezas Pruebas límite de impurezas Determinación de características de desempeño Ensayos en los que está implicada una matriz biológica.		DFPPAL p. 54
2	Métodos de cuantificación en los que se encuentra implicada una matriz biológica.		Características de calidad de deben ensayarse: Especificidad, Linealidad, Exactitud, Límite de Detección, Límite de Cuantificación, Precisión y Robustez.	DFPPAL SECCION II p. 54
3		Inicio del proceso de validación : Especificidad. Elegir opción : Definición, procedimiento experimental, validación o salida		DFESP p. 66

PASO NO	Información de entrada Usuario	Información del algoritmo	Información de salida	Localización en el diagrama
4	Opción elegida: procedimiento experimental		Se debe llevar a cabo el ensayo de identidad en: análito de interés, matriz biológica productos de degradación, metabolitos o sustancias relacionadas que puedan estar presentes en la muestra análito de interés+productos de degradación+matriz REGRESO A MENU ANTERIOR	DFESP P.66
5		Inicio del proceso de validación : Especificidad. Elegir opción : Definición, procedimiento experimental, validación o salida		DFPPAL SECCION II P. 56
6	Opción elegida: Validación (proceso de datos y cálculos)		En esta prueba no aplica el análisis estadístico, por lo que únicamente se debe reunir la información en donde se indique ausencia de interferencia entre el análisis de interés y los demás componentes.	DFESP P. 66

PASO NO	Información de entrada Usuario	Información requerida	Información del algoritmo	Localización en el diagrama
7		El parámetro siguiente es Linealidad. ¿Desea continuar el proceso de validación? S/N		DFPPAL conectores II, ESP p. 56
	Opción elegida: Continuar el proceso de validación	LINEARIDAD, elegir opción: Definición, procedimiento experimental, validación o salida		DFLINEAR P. 68
8	Opción elegida: procedimiento experimental		Linealidad del sistema. Se deben preparar una serie de estándares que contengan al menos cinco diferentes concentraciones de analito igualmente espaciados y considerando un rango de concentraciones desde 50 hasta 150%. Utilizar al menos 3 réplicas por concentración. Linealidad del método: Se deben preparar una serie de muestras que contengan los mismos componentes de la matriz en la que se encuentra la muestra problema (placebos añadidos). Preparar al menos 5 diferentes concentraciones de analito igualmente espaciado, y al menos tres réplicas. Aplicar el método propuesto y medir la respuesta analítica REGRESAR A MENU ANTERIOR.	DFLINEAR P. 67
		Linealidad del sistema, elegir opción: Definición, procedimiento experimental, validación o salida		DFLINEAR P. 67

PASO NO.	Información de entrada Usuario	Información del algoritmo	Información de salida	Localización en el diagrama
	Opción elegida: Proceso de validación (datos y cálculo)	¿Se tienen los resultados analíticos?		DF LINEAR conectores C1 LIN P. 67
13	Respuesta : SI.	Introducir número de datos de concentración = V1 Introducir número de réplicas= V2		DCALCLIN P. 76
14	Introducción de datos por el usuario V1 = 5 V2 = 3.	Introducir resultados analíticos en la matriz de resultados V1*V2		DCALCLIN P. 76

15. Introducción de resultados analíticos por el usuario

	conc.1 µg/ml	conc.2 µg/ml	conc.3 µg/ml	conc.4 µg/ml	conc.5 µg/ml
Asmtz/Aest *	0.250	1.001	7.996	19.991	39.981
Cst*					
réplica 1	0.285	1.145	9.031	23.031	45.930
réplica2	0.289	1.140	9.092	22.993	46.039
réplica3	0.297	1.149	8.957	23.087	45.086

* La respuesta analítica está indicada como: Area de sulfametazina sódica / Area del estándar interno * Concentración de sulfametazina sódica

PASO NO.	información de entrada Usuario	información requerida	información del algoritmo	información de salida
16			<p>fórmulas utilizadas por el algoritmo: promedio $\bar{x} = \frac{\sum x_i}{v_2}$</p> <p>desviación estándar $s = \frac{\sqrt{(\bar{x} - x_i)^2}}{v_2 - 1}$</p> <p>desv. est. relativa $des = s / \bar{x} * 100$</p> <p>pendiente: $b = \frac{[\sum y * \sum y^2] - [\sum y * \sum xy]}{[v_1 * \sum x^2] - [(\sum x)^2]}$</p> <p>ordenada: $a = \frac{(v_1 * \sum xy) - [\sum x * \sum y]}{(v_1 * \sum x^2) - [(\sum x)^2]}$</p>	

PASO NO.	Información de entrada Usuario	Información requerida	Información de salida	Sección del algoritmo
17			Resultados obtenidos por el algoritmo : ordenada al origen = -0.038 pendiente = 1.144 coeficiente de correlación = 0.9999 coeficiente de determinación = 0.999	DCALC LIN Conector RLIN p. 80
18			Decisión χ^2 0.98 < r^2 < 1.02 ? ; respuesta si.	DFLINEAR Conector RLIN p. 67
19			El sistema es lineal	DFLINEAR P. 67
20		El parámetro con el que procede continuar es Linealidad del método. Usted desea : Continuar el proceso de validación Salir		DFLINEAR OPCION LIN M P.67
21	Opción elegida : Continuar el proceso de validación.	χ^2 Se tienen los datos ?		DFLINEAR OPCION LIN 3.1 P. 67
22	Respuesta : Si.	Introducir número de datos de concentración = V1 Introducir número de réplicas = V2		DCALCLIN Conector Li p.76

PASO NO.	Información de entrada Usuario	Información del algoritmo		
		Información requerida	Información de salida	Sección del algoritmo
23	Introducción de datos por el usuario V1 = 5 V2 = 3	Introducir resultados analíticos en la matriz de resultados V1~V2		DCALC LIN P. 76

24 Introducción de resultados analíticos por el usuario

	cant.	cant.	cant.	cant.	cant.
	Adic.1	Adic.2	Adic.3	Adic.4	Adic.5
	mg	mg	mg	mg	mg
Asmiz/Ae	4.0026	8.0052	16.0100	24.0150	40.0250
st * Cst*					
réplica 1	2.198	4.581	9.421	13.960	23.265
réplica2	2.318	4.628	9.534	13.985	23.484
réplica3	2.375	4.686	9.624	14.268	23.502

* La respuesta analítica está indicada como: Area de sulfametazina sódica / Area del estándar interno * Concentración de sulfametazina sódica

PASO NO.	Información de entrada	Información del algoritmo
	Usuario	Información de salida
25	Información requerida	fórmulas utilizadas por el algoritmo:
		<p>promedio $\bar{x} = \frac{\sum x_i}{v_2}$ desviación estándar $s = \frac{\sqrt{(\bar{x} - x_i)^2}}{v_2 - 1}$</p> <p>desv. est. relativa $der = s/\bar{x} \cdot 100$</p> <p>pendiente: $b = \frac{[\sum y \cdot \sum y^2] - [\sum y \cdot \sum xy]}{[(v_1 \cdot \sum x^2)] - [(\sum x)^2]}$</p> <p>ordenada: $a = \frac{(v_1 \cdot \sum xy) - [\sum x \cdot \sum y]}{(v_1 \cdot \sum x^2) - [(\sum x)^2]}$</p>

PASO NO.	Información de entrada: Usuario	Información del algoritmo		
		Información requerida	Información de salida	Sección del algoritmo
26			Resultados obtenidos por el algoritmo: ordenada al origen = -0.0038 pendiente = 0.586 coeficiente de correlación = 0.9999 coeficiente de determinación = 0.999	DCALCLIN Conector RLI P. 80
27			Decisión $0.98 < r^2 < 1.02$; respuesta si.	DFLINEAR RLI p. 68
28			El método es lineal	
29		El parámetro con el que se debe continuar es EXACTITUD. Usted desea: Continuar el proceso de validación Salida		DFPPAL Conectores II, C2, EXA p. 56
30	Opción elegida: Continuar el proceso de validación	Exactitud elegir opción: Definición, procedimiento experimental, validación o salida		DFEXAC Conector EXA p. 69

PASO NO.	Información de entrada Usuario	Información del algoritmo	
		Información requerida	Información de salida
	Opción elegida: procedimiento experimental		Preparar independientemente una serie de muestras con al menos 3 puntos de concentración en el rango de 50 al 150% de la concentración especificada en el rango de trabajo. Preparar 3 réplicas por concentración. La muestra debe estar preparada en la matriz (placebos añadidos). Aplicar el método de trabajo de forma independiente para cada muestra. REGRESAR A MENU ANTERIOR
32		EXACTITUD. Usted desea ir a: Procedimiento experimental Proceso de Validación (cálculos y resultados) Salida. ¿Se tienen los datos?	DFEXAC Conector EXA p.69
33	Opción elegida: Proceso de validación (cálculos y resultados) Respuesta: Si		DFEXAC OPCION EX3 p.69
34		Introducir número de datos de concentración = v1 Introducir número de réplicas = V2	DCALC EXA Conector EX p. 81
35	Introducción de datos V1 = 5 V2 = 3	Introducir resultados analíticos en la matriz V1*V2	DCALC EXA 2/3 p. 81

Cantidad adicionada mg	Cantidad recuperada	% Recuperado
4.00260	3.99293	99.75
4.00260	4.02158	100.47
4.00260	4.12146	102.96
8.00520	7.94750	99.27
8.00520	8.03017	100.31
8.00520	8.13115	101.57
16.01040	16.24436	101.46
16.01040	16.24114	101.44
16.01040	16.49729	103.04
24.01560	24.21891	100.84
24.01560	24.26289	101.02
24.01560	24.75248	103.06
40.02598	40.36316	100.84
40.02598	40.74336	101.79
40.02598	40.77316	101.86

PASO NO.	Información de entrada Usuario	Información requerida	Información del algoritmo Información de salida
37			<p>fórmulas utilizadas por el algoritmo:</p> <p>promedio $\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n}$</p> <p>desviación estándar $s = \frac{\sqrt{(\sum x_i - \bar{x})^2}}{n - 1}$</p> <p>desv. est. relativa $de = s / \bar{x} * 100$</p> <p>pendiente: $b = \frac{[\sum y * \sum y^2] - [\sum y * \sum xy]}{[(\sum x^2)] - [(\sum x)^2]}$</p> <p>ordenada: $a = \frac{(\sum xy) - [\sum x * \sum y]}{(\sum x^2) - [(\sum x)^2]}$</p>

PASADO	Información de entrada Usuario	Información requerida	Información de salida	Sección del algoritmo
38			<p>Resultados obtenidos por el algoritmo : promedios, desviación std, y desv. est. relativa Nivel de concentración 4 mg/ml% : 101.1%, 1.68, 1.66% Nivel de concentración 8 mg/ml: 100.4% 1.14, 1.14% Nivel de concentración 16 mg/ml : 102.0% 0.91, 0.91% Nivel de concentración 24 mg/ml 101.6%, 1.23, 1.21% Nivel de concentración 40 mg/ml 101.5%, 0.57 , 0.56%</p>	DCALC EXA CONECTOR REX p. 83
39			Decisión ¿ porcentaje de recuperación entre 98 y 102% ? ; Y ¿ Coeficiente de variación menor a 2.0% ? respuesta : si	DFEXA CONECTOR REX p. 69
40			El método es EXACTO	

PASO:	Información de entrada Usuario	Información requerida	Información del algoritmo	Sección del algoritmo
41		El parámetro con el que se debe continuar el proceso de validación es Límite de Detección. Usted desea Continuar el proceso de validación Salir		DFPPAL CONECTOR C6 p. 56
42	Opción elegida: Continuar el proceso de validación	Límite de Detección, elegir opción: Definición, procedimiento experimental, validación o salida		DFLOD CONECTOR LOD p. 70
43	Opción elegida: Procedimiento experimental		Basado en la señal de ruido: Se debe comparar la respuesta de muestras de concentraciones conocidas muy bajas con la señal producida por muestras blanco. El límite de detección aceptado es la muestra cuya concentración exhiba una señal tres veces mayor a la señal que produce la muestra blanco. B) Basado en la desviación estándar de la respuesta y la pendiente: El límite de detección por este método puede ser expresado como: $LD = 3.3 (DES\ V. STD)/m$; donde DESV STD es la desviación estándar de la respuesta obtenida por la lectura de 6 muestras blanco; y m es la pendiente de la curva de calibración. REGRESO AL MENU ANTERIOR	DFLOD OPCION LOD1 Y LOD2 p. 70

PASO.	Información de entrada Usuario	Información requerida	Información del algoritmo	Sección del algoritmo
44		<p>Límite de Detección, elegir opción: Definición, procedimiento experimental, validación, continuar con el parámetro siguiente, salida</p> <p>El parámetro con el que se debe continuar del proceso de validación es Límite de Cuantificación. Usted desea Salir</p> <p>Continuar el proceso de validación</p>		DF LOD CONECTOR LOD p. 70
45	<p>Opción elegida: Continuar con el parámetro siguiente Nota: no se cuenta con los datos experimentales acorde al procedimiento experimental recomendado</p>			DFLOD CONECTOR C4 p. 70
46	<p>Opción elegida: Continuar el proceso de validación</p>	<p>Límite de Cuantificación, elegir opción: Definición, procedimiento experimental, validación, continuar con el parámetro siguiente, salida</p>		DF LOQ CONECTOR LOQ p. 71
47	<p>Opción elegida: Procedimiento experimental</p>		<p>A) Basado en la señal de ruido: Se debe comparar la respuesta de muestras de concentraciones conocidas muy bajas con la señal producida por muestras blancas. El límite de cuantificación aceptado es la muestra cuya concentración exhiba una señal diez veces mayor a la señal que produce la muestra</p>	DFLOQ Opción LOQ 2 p. 71

PASONO.	Información de entrada Usuario	Información requerida	Información del algoritmo	Sección del algoritmo
			<p>blanco.</p> <p>B) Basado en la desviación estándar de la respuesta y la pendiente. El límite de cuantificación por este método puede ser expresado como:</p> <p>$LD = 10 \cdot (DES\ V.STD)/m$; donde DESV.STD es la desviación estándar de la respuesta obtenida por la lectura de 6 muestras blanco; y m es la pendiente de la curva de calibración.</p> <p>REGRESO AL MENU ANTERIOR</p>	
48		<p>Límite de Cuantificación, elegir opción:</p> <p>Definición, procedimiento experimental, validación, continuar con el parámetro siguiente, salida</p> <p>El parámetro con el que se debe continuar del proceso de validación es PRECISION Usted desea Continuar el proceso de validación Salir</p>		DF LOQ CONECTOR LOQ p.71
49	<p>Opción elegida: Continuar con el parámetro siguiente Nota: no se cuenta con los datos experimentales acorde al procedimiento experimental</p>			DFPAL CONECTOR C4 P.56

PASO NO.	Información del algoritmo		Sección del algoritmo
	Información de entrada Usuario	Información requerida	
50	recomendado!	El parámetro siguiente es Precisión ¿Desea continuar el proceso de validación? S/N	DFPPAL SECCION II CONECTOR PREC P. 56
51	Opción elegida: Continuar el proceso de validación	Precisión, elegir opción: Definición, procedimiento experimental, validación o salida	DF PREC P. 72
52	Opción elegida: procedimiento experimental		PRECISION DEL SISTEMA: Se debe realizar por sextuplicado la lectura de respuesta de una misma solución estándar que contiene la concentración al 100% especificado. Registrar los resultados. PRECISION DEL MÉTODO: Se deben analizar por sextuplicado una muestra que contenga el análisis de interés (estándar) adicionado a la matriz en la cual se encuentra la muestra problema. Aplicar el método en cuestión independientemente para cada muestra y registrar los resultados. PRECISIÓN INTERMEDIA (REPRODUCIBILIDAD): Dos analistas en dos diferentes días deben analizar

PASO NO.	Información de entrada Usuario	Información del algoritmo		
		Información requerida	Información de salida	Sección del algoritmo
53		Precisión, elegir opción: Definición, procedimiento experimental, validación o salida	independientemente tres réplicas de placebos añadidos con el analito de interés en una concentración equivalente al 100%. Regresar al menú anterior	DFPREC CONECTOR PRECISION P. 72
54	Opción elegida: Proceso de Validación (datos y cálculos)	PRECISION DEL SISTEMA (REPETIBILIDAD). ¿Se tienen los datos ?		DFPREC OPCION PREC3.1 P. 72
55	Respuesta: Si	Introducción de resultados analíticos = dato (i)		DCALCREP CONECTOR REP P.84
56	Introducción de resultados por el usuario :			DCALC REP P.84

PASO NO.	Información de entrada Usuario	Información requerida	Información del algoritmo	Sección del algoritmo
	Concentración 19.99140 µg/ml Respuestas (área) 23.03117 23.06257 22.99369 23.16667 23.08799 22.91903			
57			fórmulas utilizadas por el algoritmo: promedio $\bar{x} = \frac{\sum xi}{n}$ desviación estándar $s = \frac{\sqrt{\sum (xi - \bar{x})^2}}{n - 1}$ desv. est. relativa $der = s / \bar{x} * 100$	
58			Resultados : promedio=23.04 desviación estándar 0.84 desviación estándar relativa : 0.37 %	DCALC REP CONECTOR RREP P.85

PASO	Información de entrada Usuario	Información requerida	Información del algoritmo	Sección del algoritmo
59			Decisión ¿ Desviación estándar relativa menor a 2.0% ? respuesta : si	DF PREC CONECTOR RREP P. 72
			El sistema es preciso	DFPREC CONECTOR RREP P. 72
60		El parámetro con el que se debe continuar la validación es precisión del método. Usted desea : Continuar el proceso de validación Salir		DFPREC CONECTOR PRM P. 72
61	Opción elegida: Continuar el proceso de validación	PRECISION DEL MÉTODO. ¿Se tienen los datos ?		DFPREC CONECTOR PRM P. 73
62	Respuesta : Si	Introducir resultados analíticos dato (i)		DCALCREP CONECTOR REP P. 84

PASO NO.	Información del algoritmo		Sección del algoritmo
	Información de entrada Usuario	Información de salida	
63	Introducción de datos por el usuario : Nivel de concentración 19.9 µg/ml %recuperado: 96.21 96.71 99.21 98.30 99.03 101.22	<p>formulas utilizadas por el algoritmo:</p> <p>promedio $\bar{x} = \frac{\sum xi}{v2}$</p> <p>desviación estándar $s = \frac{\sqrt{(\bar{x} - xi)^2}}{v2 - 1}$</p> <p>desv. est. relativa $der = s / \bar{x} * 100$</p>	DCALREP p.85
64		<p>Resultados :</p> <p>promedio= 98.4%</p> <p>desviación estándar = 1.8</p> <p>desviación estándar relativa : 1.8%</p>	DCALCREP CONECTOR RREP p. 85
65		<p>Decisión</p> <p>¿ Desviación estándar relativa menor a 2.0% ? respuesta : si</p>	DFPREC CONECTOR RREP p.73
66		El método es preciso.	DFPREC CONECTOR RREP p. 73

PASANO.	Información de entrada Usuario	Información del algoritmo	
		Información requerida	Información de salida algoritmo
67		El parámetro que se debe evaluar a continuación es precisión intermedia o reproducibilidad. Usted desea: Continuar el proceso de validación Salir	DFPREC OPCION PREC3.3 p. 73
68	Opción elegida: Continuar el proceso de validación	REPRODUCIBILIDAD. ¿Se tienen los datos ?	DCALCREPR 1/4 p. 86 REPR
69	Respuesta : Si	Introducir datos en la siguiente matriz de resultados : $Y(i,j,k)$	

70.- Resultados analíticos introducidos por el usuario

	dia 1	dia 2
analista 1	95.59% 96.12% 96.75%	95.71% 96.86% 102.35
analista 2	95.71% 96.86% 102.35%	96.21% 96.71% 98.29%

* Nivel de concentración 19.9 µg/mL

PASO NO.	información de entrada Usuario	información requerida	información del algoritmo información de salida
71			<p>Fórmulas utilizadas para el proceso de datos:</p> $Y_{11} = y_{111} + y_{112} + y_{113}$ $Y_{21} = y_{211} + y_{212} + y_{213}$ $Y_{1..} = Y_{11} + Y_{12}$ $Y_{..} = Y_{1..} + Y_{2..}$ $\sum Y_{ij}^2 = (Y_{11})^2 + (Y_{12})^2 + (Y_{21})^2 + (Y_{22})^2$

72 Resultados de salida proporcionados por el algoritmo

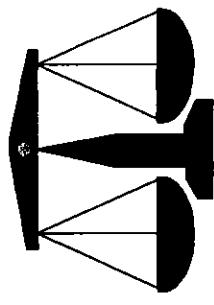
Fuente de variación	grados de libertad	sumas de cuadrados	cuadrado medio	Fcalc	Ftab. (gix/gie) a= 0.05
Analista	1	0.6329	0.6329	0.1369	7.57
Día	2	9.2447	4.6223	0.6924	6.06
Error	8	53.4052	6.6756		
Total	11				

PASO NO.	Información de entrada Usuario	Información requerida	Información del algoritmo	Sección del algoritmo
73			<p>otros datos de salida promedio : 97.4% 2.4 desviación estándar desviación estándar relativa 2.5%</p>	DCALC REPR CONECTOR RREPR p. 89
75			<p>Decisión : ¿Fcalc (analista)<Ftab 1,8 0.05? respuesta : si EL METODO ES REPRODUCIBLE POR LOS ANALISTAS Decisión: ¿Fcalc(día)<Ftab 2,8, 0.05 ? Respuesta: si EL METODO ES REPRODUCIBLE ENTRE DIAS</p>	DF PREC 3/3 CONECTOR RREPR p. 74
76		El parámetro con el que se debe continuar del proceso de validación es ROBUSTEZ Usted desea Continuar el proceso de validación Salir		DFPAL p. 56

PASO NO.		Información de entrada	Información del algoritmo	
		Usuario	información requerida	información de salida
77	Opción elegida: Continuar el proceso de validación	Robustez, elegir opción: Definición, procedimiento experimental, validación o salida	DF ROBUS 1/1 p. 75	Sección del algoritmo
78	Opción elegida: procedimiento experimental		Se deben seleccionar los factores que bajo una variedad de circunstancias podrían modificar la respuesta analítica. El número de factores para realizar una corrida de 8 experimentos es entre 3 y 7. Realizar los experimentos acorde al arreglo factorial Plackette Burman en orden aleatorio. Calcular efectos, y por medio de un análisis de varianza, comprobar la significancia de éstos sobre la respuesta. REGRESAR A MENU ANTERIOR	DF ROBUS OPCIÓN ROB1 Y ROB2 p. 75
79		Robustez elegir opción: Definición, procedimiento experimental, validación o salida	DF ROBUS 1/1 CONECTOR ROB p.75	
80	Opción elegida: SALIDA		DF ROBUS 1/1 OPCION ROB4	

Anexo 3.

Comparación entre
resultados obtenidos
por el algoritmo y
los reportados



ANEXO 3. Comparación de los resultados obtenidos por el algoritmo y reportados para cada caso de estudio

5.2.1.1 Caso de estudio 1: Métodos para evaluación de identidad*

Método para identificación de naproxén sódico en tabletas por espectroscopia infrarroja ²⁴

Nivel de validación seleccionado en el laboratorio para el caso de estudio	Nivel de Validación recomendado por el algoritmo.
Especificidad	Especificidad Robustez

<i>Procedimiento llevado a cabo en el laboratorio para el caso de estudio</i>	<i>Procedimiento recomendado acorde a la solución del algoritmo.</i>
Especificidad / Selectividad	
Con el método propuesto se analizaron muestras de: Naproxén sódico (estándar) Excipientes Naproxén + excipientes	Se deben llevar a cabo el ensayo de identidad en: analito de interés, analito de interés + excipientes analito de interés + productos de degradación o sustancias relacionadas que puedan estar presentes en la muestra
Robustez	
Parámetro no evaluado en el caso de estudio	Se deben seleccionar los factores que bajo una variedad de circunstancias podrían modificar la respuesta analítica. El número de factores para realizar una corrida de 8 experimentos es entre 3 y 7. Realizar los experimentos acorde al arreglo matricial Plackette Burman en orden aleatorio. Calcular efectos, y por medio de un análisis de varianza, comprobar la significancia de éstos sobre la respuesta.

* Los resultados para el caso de estudio se encuentran en las páginas 101-103

Parámetros estadísticos y especificaciones utilizados en el caso de estudio		Parámetros estadísticos y especificaciones recomendados en el algoritmo.	
Parámetro	Estimadores y especificaciones	Parámetro	Estimadores y especificaciones
Especificidad	No aplica la evaluación estadística	Especificidad	No aplica la evaluación estadística
		Robustez	Matriz Plackette-Burman para averiguar influencia no significativa en la respuesta analítica por factores en condiciones de cambio

<i>Resultados obtenidos durante el proceso de datos en el caso de estudio</i>		<i>Resultados obtenidos durante el proceso de datos por el algoritmo.</i>	
Especificidad / Selectividad			
Ausencia de interferencia, entre las señales obtenidas del analito de interés, excipientes, y productos de degradación. No aplica el análisis estadístico.		No aplica el análisis estadístico, por lo que debe reunirse la documentación que demuestre ausencia de interferencia entre las respuestas del analito de interés y los demás componentes presentes en la muestra.	
Robustez			
Proceso experimental no realizado en el caso de estudio		No se cuenta con los datos experimentales solicitados por el algoritmo. Parámetro no calculado.	

5.2.1.2 Caso de estudio 2: Métodos para cuantificación de principio activo*

Método para cuantificación de sulfametazina sódica en materia prima por cromatografía de líquidos de alta resolución.²⁴

Nivel de validación seleccionado en el laboratorio para el caso de estudio	Nivel de Validación recomendado por el algoritmo.
Especificidad	Especificidad
Linealidad	Linealidad
Sistema	Sistema
Método	Método
Exactitud	Exactitud
Precisión	Precisión
Sistema	Sistema
Método (repetibilidad y reproducibilidad)	Método (repetibilidad y reproducibilidad)
	Robustez

<i>Procedimiento llevado a cabo en el laboratorio para el caso de estudio</i>	<i>Procedimiento recomendado acorde a la solución del algoritmo.</i>
Especificidad / Selectividad	
Se analizaron muestras de: Sulfametazina sódica (estándar) Sulfametazina sódica + estándar interno Sulfametazina sódica + productos de degradación+ estándar interno Metanol como disolvente (blanco)	Se deben llevar a cabo el ensayo de identidad en: analito de interés, analito de interés + productos de degradación o sustancias relacionadas que puedan estar presentes en la muestra blanco
Linealidad del sistema	
Se prepararon por sextuplicado soluciones en cinco concentraciones crecientes, a partir de una solución patrón de sulfametazina sódica y se calcularon parámetros de regresión.	Se deben preparar una serie de estándares que contengan al menos 5 diferentes concentraciones de analito igualmente espaciados y considerando un rango de concentraciones desde 50 hasta 150%. Utilizar al menos 3 réplicas por concentración.
Linealidad del método	
Se prepararon soluciones de sulfametazina sódica estándar a cinco niveles de concentración, adicionando la muestra con productos de degradación y se realizó por triplicado el proceso de extracción y análisis para cada concentración, inyectándose posteriormente al sistema cromatográfico	Se deben preparar una serie de estándares que contengan al menos 5 diferentes concentraciones de analito igualmente espaciados y considerando un rango de concentraciones desde 50 hasta 150%. Utilizar al menos 3 réplicas por concentración.

* Los resultados para el caso de estudio se encuentran en las páginas 104-122

<i>Procedimiento llevado a cabo en el laboratorio para el caso de estudio</i>		<i>Procedimiento recomendado acorde a la solución del algoritmo.</i>	
Exactitud			
Se prepararon soluciones de sulfametazina sódica estándar adicionada de productos de degradación a tres niveles de concentración; se aplicó el procedimiento de extracción e inyección por sextuplicado.	Preparar independientemente una serie de muestras con al menos 3 puntos de concentración en el rango de 50 al 150% de la concentración especificada en el rango de trabajo. Preparar al menos tres réplicas por concentración. La muestra debe estar preparada en las mismas condiciones. Aplicar el método de trabajo de forma independiente para cada muestra.		
Precisión del sistema.			
Se realizaron por sextuplicado la inyección al sistema cromatográfico de soluciones acuosas a tres niveles de concentración de sulfametazina sódica estándar preparadas a partir de una misma solución patrón y se registraron los resultados.	Se debe realizar por sextuplicado la lectura de respuesta de una misma solución estándar que contiene la concentración al 100% especificado. Registrar los resultados.		
Precisión del método (repetibilidad)			
Se prepararon soluciones de sulfametazina sódica estándar adicionada de productos de degradación a un nivel de concentración por sextuplicado, se aplicó el procedimiento de extracción e inyección.	Se debe preparar por sextuplicado una muestra que contenga el analito de interés (estándar) en las mismas condiciones de la muestra problema. Aplicar el método en cuestión independientemente para cada muestra y registrar los resultados.		
Precisión del método (reproducibilidad o precisión intermedia).			
Se realizó el análisis de una muestra de sulfametazina sódica adicionada de productos de degradación por dos analistas, por triplicado en dos días diferentes, para posteriormente realizar un análisis de varianza.	Dos analistas en dos diferentes días deben analizar independientemente tres réplicas de la muestra en las mismas condiciones que la muestra problema en una concentración equivalente al 100%.		
Robustez			
Parámetro no evaluado en el caso de estudio.	Se deben seleccionar los factores que bajo una variedad de circunstancias podrían modificar la respuesta analítica. El número de factores para realizar una corrida de 8 experimentos es entre 3 y 7. Realizar los experimentos acorde al arreglo matricial Plackette Burman en orden aleatorio. Calcular efectos, y por medio de un análisis de varianza, comprobar la significancia de éstos sobre la respuesta.		

Parámetros estadísticos y especificaciones utilizados en el caso de estudio		Parámetros estadísticos y especificaciones recomendados en el algoritmo.	
Parámetro	Estimadores y especificaciones	Parámetro	Estimadores y especificaciones
Especificidad	No aplica la evaluación estadística	Especificidad	No aplica la evaluación estadística
Linealidad Sistema	$0.98 < r^2 < 1.02$; cálculo de parámetros de regresión	Linealidad Sistema	$0.98 < r^2 < 1.02$; cálculo de parámetros de regresión
Método	$0.98 < r^2 < 1.02$; cálculo de parámetros de regresión	Método	$0.98 < r^2 < 1.02$; cálculo de parámetros de regresión
Exactitud	% de recuperación 98-102%	Exactitud	% de recuperación 98-102%
Precisión Sistema	DER < 2.0%	Precisión	DER < 2.0%
Método (repetibilidad y reproducibilidad)	DER < 2.0%, cálculo de F de Fischer, fuente de variación no significativa	Sistema Método (repetibilidad y reproducibilidad)	DER. < 2.0%, cálculo de F de Fischer, fuente de variación no significativa
		Robustez	Matriz Plackette-Burman para averiguar Influencia no significativa en la respuesta analítica por factores en condiciones de cambio

Resultados obtenidos durante el proceso de datos en el caso de estudio			Resultados obtenidos durante el proceso de datos por el algoritmo.		
Especificidad / Selectividad					
Ausencia de interferencia, entre las señales obtenidas del analito de interés, excipientes, estándar interno y productos de degradación. No aplica el análisis estadístico.			No aplica el análisis estadístico, por lo que debe reunirse la documentación que demuestre ausencia de interferencia entre las respuestas del analito de interés y los demás componentes presentes en la muestra.		
Linealidad del sistema					
ordenada al origen = -0.999 pendiente = 1.18 coeficiente de correlación = 0.9999 coeficiente de determinación = 0.999 El sistema es lineal ($0.98 < r^2 < 1.02$)			ordenada al origen = -0.999 pendiente = 1.18 coeficiente de correlación = 0.9999 coeficiente de determinación = 0.999 El sistema es lineal ($0.98 < r^2 < 1.02$)		
Linealidad del método					
ordenada al origen = -4.78 pendiente = 1.0421 coeficiente de correlación = 0.994 coeficiente de determinación = 0.9881 El método es lineal ($0.98 < r^2 < 1.02$)			ordenada al origen = -4.78 pendiente = 1.0421 coeficiente de correlación = 0.994 coeficiente de determinación = 0.9881 El método es lineal ($0.98 < r^2 < 1.02$)		
Exactitud					
Nivel de conc. 105% Recuperación 100.09%	Nivel de conc. 105% Desv.std 0.35	Nivel de conc. 105% DER 0.35%	Nivel de conc. 105% Recuperación 100.09%	Nivel de conc. 105% Desv.std 0.35	Nivel de conc. 105% DER 0.35%
Nivel de conc. 100% Recuperación 100.36%	Nivel de conc. 100% Desv.std 0.55	Nivel de conc. 100% DER 0.55%	Nivel de conc. 100% Recuperación 100.36%	Nivel de conc. 100% Desv.std 0.55	Nivel de conc. 100% DER 0.55%
Nivel de conc. 95% Recuperación 99.98%	Nivel de conc. 95% Desv.std 0.45	Nivel de conc. 95% DER 0.45%	Nivel de conc. 95% Recuperación 99.98%	Nivel de conc. 95% Desv.std 0.45	Nivel de conc. 95% DER 0.45%
Nota : Resultados reportados en porcentaje de recuperación. El método es exacto			Nota : Resultados reportados en porcentaje de recuperación. El método es exacto		
Precisión del sistema					
Promedio=210.78 Desviación estándar 0.50 Desviación estándar relativa: 0.24 % El sistema es lineal			Promedio=210.78 Desviación estándar 0.50 Desviación estándar relativa: 0.24 % El sistema es lineal		

Resultados obtenidos durante el proceso de datos en el caso de estudio	Resultados obtenidos durante el proceso de datos por el algoritmo.
Precisión del método (repetibilidad)	
Promedio 100.09 desviación estándar = 0.27 Desviación estándar relativa: 0.27% El método es preciso	Promedio 100.09 desviación estándar = 0.27 Desviación estándar relativa: 0.27% El método es preciso
Precisión del método (reproducibilidad o precisión intermedia)	
Fcalc (analista) < Ftab 1,8 0.05% Fcalc (día) < Ftab 1/8 0.05% EL METODO ES REPRODUCIBLE POR LOS ANALISTAS Y ENTRE DIAS	Fcalc (analista) < Ftab 1,8 0.05% Fcalc (día) < Ftab 1/8 0.05% EL METODO ES REPRODUCIBLE POR LOS ANALISTAS Y ENTRE DIAS
Robustez	
Proceso experimental no realizado en el caso de estudio	No se cuenta con los datos experimentales solicitados por el algoritmo. Parámetro no calculado.

5.2.1.3 Caso de estudio 3: Métodos para determinación cuantitativa de impurezas*

Método para cuantificación de impurezas orgánicas volátiles en sulfametoxazol materia prima para uso farmacéutico por cromatografía de gases.

Nivel de validación seleccionado en el laboratorio para el caso de estudio	Nivel de Validación recomendado por el algoritmo.
Linealidad Sistema Método	Especificidad Linealidad
Exactitud Precisión	Sistema Método
Sistema Método (repetibilidad)	Exactitud Limite de cuantificación Precisión
	Sistema Método (repetibilidad y reproducibilidad)
	Robustez

Procedimiento llevado a cabo en el laboratorio para el caso de estudio	Procedimiento recomendado acorde a la solución del algoritmo.
	Especificidad / Selectividad
No efectuado	Se deben llevar a cabo el ensayo de identidad en: analito de interés, analito de interés + excipientes, productos de degradación o sustancias relacionadas que puedan estar presentes en la muestra
	Linealidad del sistema
Se prepararon por cuadruplicado soluciones en cinco concentraciones crecientes, a partir de una solución patrón y se calcularon parámetros de regresión.	Se deben preparar una serie de estándares que contengan al menos cinco diferentes concentraciones de analito igualmente espaciados y considerando un rango de concentraciones desde 50 hasta 150%. Utilizar al menos 3 réplicas por concentración.
	Linealidad del método
Se prepararon soluciones de benceno (impureza) estándar a tres concentraciones y se realizó por triplicado el proceso de extracción y análisis para cada concentración, inyectándose posteriormente al sistema cromatográfico	Se deben preparar una serie de estándares que contengan al menos cinco diferentes concentraciones de analito igualmente espaciados y considerando un rango de concentraciones desde 50 hasta 150%. Utilizar al menos 3 réplicas por concentración.

* Los resultados para el caso de estudio se encuentran en las páginas 123-137

Procedimiento llevado a cabo en el Procedimiento recomendado acorde a la solución del algoritmo.
laboratorio para el caso de estudio

Exactitud

Se prepararon soluciones de sulfametoxazol adicionado de benceno a tres niveles de concentración por cuadruplicado, se aplicó el procedimiento de extracción e inyección. Preparar independientemente una serie de muestras con al menos 3 puntos de concentración en el rango de 50 al 150% de la concentración especificada en el rango de trabajo. Preparar al menos tres réplicas por concentración. La muestra debe estar preparada en la matriz (placebos añadidos.). Aplicar el método de trabajo de forma independiente para cada muestra.

Límite de Cuantificación

Parámetro no evaluado en el caso de estudio Basado en la señal de ruido: Se debe comparar la respuesta de muestras de concentraciones conocidas muy bajas con la señal producida por muestras blanco. El límite de cuantificación aceptado es la muestra cuya concentración exhiba una señal diez veces mayor a la señal que produce la muestra blanco.
B) Basado en la desviación estándar de la respuesta y la pendiente: El límite de cuantificación por este método puede ser expresado como:
 $LD = 10 \cdot (DES.V.STD)/m$; donde DES.V.STD es la desviación estándar de la respuesta obtenida por la lectura de 6 muestras blanco; y m es la pendiente de la curva de calibración.
REGRESO AL MENU ANTERIOR

Precisión del sistema

Se realizaron por cuadruplicado la inyección al sistema cromatográfico de soluciones a un valor de concentración de benceno y se registraron los resultados. Se debe realizar por sextuplicado la lectura de respuesta de una misma solución estándar que contiene la concentración al 100% especificado. Registrar los resultados

Precisión del método (repetibilidad)

Se prepararon soluciones de sulfametoxazol adicionado de benceno a un nivel de concentración y por cuadruplicado, se aplicó el procedimiento de extracción e inyección. Se debe preparar por sextuplicado una muestra que contenga el analito de interés (estándar) adicionado a la matriz en la cual se encuentra la muestra problema. Aplicar el método en cuestión independientemente para cada muestra y registrar los resultados.

Precisión del método (reproducibilidad o precisión intermedia)

Parámetro no evaluado en el caso de estudio Dos analistas en dos diferentes días deben analizar independientemente tres réplicas de placebos añadidos con el analito de interés en una concentración equivalente al 100%.

Procedimiento llevado a cabo en el laboratorio para el caso de estudio *Procedimiento recomendado acorde a la solución del algoritmo.*

Robustez

<p>Parámetro no evaluado en el caso de estudio</p>	<p>Se deben seleccionar los factores que bajo una variedad de circunstancias podrían modificar la respuesta analítica. El número de factores para realizar una corrida de 8 experimentos es entre 3 y 7. Realizar los experimentos acorde al arreglo matricial Plackette Burman en orden aleatorio. Calcular efectos, y por medio de un análisis de varianza, comprobar la significancia de éstos sobre la respuesta.</p>
--	---

Parámetros estadísticos y especificaciones utilizados en el caso de estudio		Parámetros estadísticos y especificaciones recomendados en el algoritmo.	
Parámetro	Estimadores y especificaciones	Parámetro	Estimadores y especificaciones
Especificidad	No aplica la evaluación estadística	Especificidad	No aplica la evaluación estadística
Linealidad Sistema	$0.98 < r^2 < 1.02$; cálculo de parámetros de regresión	Linealidad Sistema	$0.98 < r^2 < 1.02$; cálculo de parámetros de regresión
Método	$0.98 < r^2 < 1.02$; cálculo de parámetros de regresión	Método	$0.98 < r^2 < 1.02$; cálculo de parámetros de regresión
Exactitud	% de recuperación 80-120%	Exactitud	% de recuperación 98-102%
Precisión Sistema	DER < 3.0%	Límite de cuantificación	10:1 señal de ruido.
Método (repetibilidad)	DER < 2.0%	Precisión Sistema Método (repetibilidad y reproducibilidad)	DER < 2.0%, cálculo de F de Fischer, fuente de variación no significativa
		Robustez	Matriz Plackette-Burman para averiguar influencia no significativa en la respuesta analítica por factores en condiciones de cambio

Resultados obtenidos durante el proceso de datos en el caso de estudio Resultados obtenidos durante el proceso de datos por el algoritmo.

Especificidad / Selectividad

No efectuado experimentalmente No aplica el análisis estadístico, por lo que debe reunirse la documentación que demuestre ausencia de interferencia entre las respuestas del analito de interés y los demás componentes presentes en la muestra.

Linealidad del sistema

ordenada al origen = -0.00517
pendiente = 0.22643
coeficiente de correlación = 0.99141
coeficiente de determinación = 0.9848
El sistema es lineal Número de datos insuficientes (3 valores de concentración y 3 réplicas). Cálculo no efectuado. Los resultados no son concluyentes

Linealidad del método

ordenada al origen = 0.149
pendiente = 0.8335
coeficiente de correlación = 0.992
coeficiente de determinación = 0.98481
El método es lineal Número de datos insuficientes (3 valores de concentración y 3 réplicas). Cálculo no efectuado. Los resultados no son concluyentes

Exactitud

Nivel de conc. 80% Recuperación 90.70%	Nivel de conc. 80% Desv.std 2.61	Nivel de conc. 80% DER 2.88%	Nivel de conc. 80% Recuperación 90.70%	Nivel de conc. 80% Desv.std 2.61	Nivel de conc. 80% DER 2.88%
Nivel de conc. 100% Recuperación 90.49%	Nivel de conc. 100% Desv.std 2.01	Nivel de conc. 100% DER 2.22%	Nivel de conc. 100% Recuperación 90.49%	Nivel de conc. 100% Desv.std 2.01	Nivel de conc. 100% DER 2.22%
Nivel de conc. 120% Recuperación 88.48%	Nivel de conc. 120% Desv.std 1.87	Nivel de conc. 120% DER 2.11%	Nivel de conc. 120% Recuperación 88.48%	Nivel de conc. 120% Desv.std 1.87	Nivel de conc. 120% DER 2.11%

El método es exacto acorde a especificación recuperación = 80-120% El método no es exacto, acorde a especificación 98-102%

Limite de Cuantificación

No evaluado en el caso de estudio Parámetro no evaluado por no contarse con resultados experimentales

Resultados obtenidos durante el proceso de datos en el caso de estudio	Resultados obtenidos durante el proceso de datos por el algoritmo.
Precisión del sistema	
n=4 promedio=1.4 *10 ⁻⁵ desviación estándar 7.8*10 ⁻⁷ Desviación estándar relativa: 5.51%	Los resultados analíticos no cumplen con el requerimiento mínimo (n debe ser al menos 6) Los resultados no son concluyentes
Precisión del método (repetibilidad)	
n=4 promedio=1.52 desviación estándar 0.11 Desviación estándar relativa: 7.57%	Los resultados analíticos no cumplen con el requerimiento mínimo (n debe ser al menos 6) Los resultados no son concluyentes
Precisión del método (reproducibilidad)	
No evaluado en el caso de estudio	Parámetro no evaluado por no contarse con resultados experimentales
Robustez	
Proceso experimental no realizado en el caso de estudio	No se cuenta con los datos experimentales solicitados por el algoritmo. Parámetro no calculado.

5.2.1.4 Caso de estudio 4: Métodos de ensayo en los que está implicada una matriz biológica*

Método para cuantificación de sulfametazina sódica en materia prima y plasma por cromatografía de líquidos de alta resolución³¹.

Nivel de validación seleccionado en el laboratorio para el caso de estudio	Nivel de Validación recomendado por el algoritmo.
Especificidad Linealidad Sistema Método Exactitud Precisión Sistema Método (repetibilidad y reproducibilidad) Límite de detección Límite de cuantificación	Especificidad Linealidad Sistema Método Exactitud Límite de detección Límite de cuantificación Precisión Sistema Método (repetibilidad y reproducibilidad) Robustez

Procedimiento llevado a cabo en el laboratorio para el caso de estudio	Procedimiento recomendado acorde a la solución del algoritmo.
Especificidad / Selectividad	
Se inyectaron al cromatógrafo muestras de: Plasma Plasma + estándar interno Plasma + analito de interés y Plasma + estándar interno + analito de interés + productos de degradación	Se debe llevar a cabo el ensayo de identidad en: analito de interés, matriz biológica matriz + metabolitos, sustancias relacionadas que puedan estar presentes en la muestra
Linealidad del sistema	
Se prepararon por triplicado soluciones en cinco concentraciones crecientes, a partir de una solución patrón de sulfametazina sódica y se calcularon parámetros de regresión.	Se deben preparar una serie de estándares que contengan al menos cinco diferentes concentraciones de analito igualmente espaciados y considerando un rango de concentraciones desde 50 hasta 150%. Utilizar al menos 3 réplicas por concentración.

* Resultados del caso de estudio en páginas 138-162

Procedimiento llevado a cabo en el laboratorio para el caso de estudio

Procedimiento recomendado acorde a la solución del algoritmo.

Linealidad del método.

Se prepararon soluciones de sulfametazina sódica estándar a cinco concentraciones crecientes en plasma, y se realizó por triplicado el proceso de extracción y análisis para cada concentración, inyectándose posteriormente al sistema cromatográfico

Se deben preparar una serie de estándares preparados en la misma matriz que contiene la muestra, y considerando al menos cinco diferentes concentraciones de analito igualmente espaciados y un rango de concentraciones desde 50 hasta 150%. Utilizar al menos 3 réplicas por concentración.

Exactitud:

Se prepararon soluciones de sulfametazina sódica estándar en plasma a cinco niveles de concentración por triplicado, se aplicó el procedimiento de extracción e inyección.

Preparar independientemente una serie de muestras con al menos 3 puntos de concentración en el rango de 50 al 150% de la concentración especificada en el rango de trabajo. Preparar al menos tres réplicas por concentración. La muestra debe estar preparada en la matriz (placebos añadidos.). Aplicar el método de trabajo de forma independiente para cada muestra.

Límite de detección

Se preparó una curva patrón a bajas concentraciones, se evaluaron los parámetros de regresión y el límite de detección se calculó como el límite de confianza inferior del intercepto.

Basado en la señal de ruido: Se debe comparar la respuesta de muestras de concentraciones conocidas muy bajas con la señal producida por muestras blanco. El límite de detección aceptado es la muestra cuya concentración exhiba una señal tres veces mayor a la señal que produce la muestra blanco.
B) Basado en la desviación estándar de la respuesta y la pendiente: El límite de detección por este método puede ser expresado como:

$LD = 3.3 (DES.V.STD)/m$; donde DESV.STD es la desviación estándar de la respuesta obtenida por la lectura de 6 muestras blanco; y m es la pendiente de la curva de calibración.

Límite de cuantificación

Se preparó una curva patrón a bajas concentraciones, se evaluaron los parámetros de regresión y el límite de detección se calculó como el límite de confianza superior del intercepto.

Basado en la señal de ruido: Se debe comparar la respuesta de muestras de concentraciones conocidas muy bajas con la señal producida por muestras blanco. El límite de cuantificación aceptado es la muestra cuya concentración exhiba una señal diez veces mayor a la señal que produce la muestra blanco.
B) Basado en la desviación estándar de la respuesta y la pendiente: El límite de detección por este método puede ser expresado como:

<p>Procedimiento llevado a cabo en el laboratorio para el caso de estudio.</p>	<p>el Procedimiento recomendado acorde a la solución del algoritmo.</p>
	<p>$LD = 10 \cdot (DES\cdot STD)/m$; donde DESV.STD es la desviación estándar de la respuesta obtenida por la lectura de 6 muestras blanco; y m es la pendiente de la curva de calibración.</p>
<p>Precisión del sistema</p>	
<p>Se realizaron por sextuplicado la inyección al sistema cromatográfico de soluciones acuosas a un nivel de concentración (19.9 µg/mL) de sulfametazina sódica estándar y se registraron los resultados.</p>	<p>Se debe realizar por sextuplicado la lectura de respuesta de una misma solución estándar que contiene la concentración al 100% especificado. Registrar los resultados.</p>
<p>Precisión del método (repetibilidad)</p>	
<p>Se prepararon soluciones de sulfametazina sódica estándar en plasma a un nivel de concentración por sextuplicado, se aplicó el procedimiento de extracción e inyección.</p>	<p>Se debe preparar por sextuplicado una muestra que contenga el analito de interés (estándar) adicionado a la matriz en la cual se encuentra la muestra problema. Aplicar el método en cuestión independientemente para cada muestra y registrar los resultados.</p>
<p>Precisión del método (reproducibilidad o precisión intermedia)</p>	
<p>Se prepararon soluciones de sulfametazina sódica estándar en plasma a un nivel de concentración (19.9 µg/mL) por triplicado, se analizó por dos diferentes analistas en dos diferentes días.</p>	<p>Dos analistas en dos diferentes días deben analizar independientemente tres réplicas de placebos añadidos con el analito de interés en una concentración equivalente al 100%.</p>
<p>Robustez</p>	
<p>Parámetro no evaluado en el caso de estudio</p>	<p>Se deben seleccionar los factores que bajo una variedad de circunstancias podrían modificar la respuesta analítica. El número de factores para realizar una corrida de 8 experimentos es entre 3 y 7. Realizar los experimentos acorde al arreglo matricial Plackette Burman en orden aleatorio. Calcular efectos, y por medio de un análisis de varianza, comprobar la significancia de éstos sobre la respuesta.</p>

Parámetros estadísticos y especificaciones utilizados en el caso de estudio		Parámetros estadísticos y especificaciones recomendados en el algoritmo.	
Parámetro	Estimadores y especificaciones	Parámetro	Estimadores y especificaciones
Especificidad	No aplica la evaluación estadística	Especificidad	No aplica la evaluación estadística
Linealidad Sistema	$0.98 < r^2 < 1.02$; cálculo de parámetros de regresión	Linealidad Sistema	$0.98 < r^2 < 1.02$; cálculo de parámetros de regresión
Método	$0.98 < r^2 < 1.02$; cálculo de parámetros de regresión	Método	$0.98 < r^2 < 1.02$; cálculo de parámetros de regresión
Exactitud	% de recuperación 98-102%	Exactitud	% de recuperación 98-102%
Precisión Sistema	DER < 2.0%	Límite de detección Límite de cuantificación	3:1 señal de ruido 10:1 señal de ruido.
Método (repetibilidad y reproducibilidad)	DER < 2.0%, cálculo de F de Fischer, fuente de variación no significativa	Precisión Sistema Método (repetibilidad y reproducibilidad)	DER < 2.0%
Límite de detección	No se indica alguna especificación		DER < 2.0%, cálculo de F de Fischer, fuente de variación no significativa
Límite de cuantificación	No se indica alguna especificación	Robustez	Matriz Plackette-Burman para averiguar influencia no significativa en la respuesta analítica por factores en condiciones de cambio

Resultados obtenidos durante el proceso de datos en el caso de estudio			Resultados obtenidos durante el proceso de datos por el algoritmo.		
Especificidad / Selectividad					
Ausencia de interferencia, entre las señales obtenidas del análisis de interés, componentes del plasma, estándar interno y productos de degradación. No aplica el análisis estadístico.			No aplica el análisis estadístico, por lo que debe reunirse la documentación que demuestre ausencia de interferencia entre las respuestas del análisis de interés y los demás componentes presentes en la muestra.		
Linealidad del sistema					
ordenada al origen = -0.038 pendiente = 1.144 coeficiente de correlación = 0.9999 coeficiente de determinación = 0.999 El sistema es lineal			ordenada al origen = -0.038 pendiente = 1.144 coeficiente de correlación = 0.9999 coeficiente de determinación = 0.999 El método es lineal		
Linealidad del método					
ordenada al origen = -0.004 pendiente = 0.586 coeficiente de correlación = 0.9999 coeficiente de determinación = 0.999 El sistema es lineal			ordenada al origen = -0.004 pendiente = 0.586 coeficiente de correlación = 0.9999 coeficiente de determinación = 0.999 El sistema es lineal		
Exactitud					
Nivel de conc. 4 mg/ml Recuperación 101.1%	Nivel de conc. 4 mg/ml Desv. std 1.68	Nivel de conc. 4 mg/ml DER 1.66%	Nivel de conc. 4 mg/ml Recuperación 101.1%	Nivel de conc. 4 mg/ml Desv. std 1.68	Nivel de conc. 4 mg/ml DER 1.66%
Nivel de conc. 8 mg/ml Recuperación 100.4%	Nivel de conc. 8 mg/ml Desv. std 1.14	Nivel de conc. 8 mg/ml DER 1.14	Nivel de conc. 8 mg/ml Recuperación 100.4%	Nivel de conc. 8 mg/ml Desv. std 1.14	Nivel de conc. 8 mg/ml DER 1.14%
Nivel de conc. 16 mg/ml Recuperación 102.0%	Nivel de conc. 16 mg/ml Desv. std 0.91	Nivel de conc. 16 mg/ml DER 0.91%	Nivel de conc. 16 mg/ml Recuperación 102.0%	Nivel de conc. 16 mg/ml Desv. std 0.91	Nivel de conc. 16 mg/ml DER 0.91 %
El método es exacto			El método es exacto		
Límite de detección					
0.03 µg/mL, calculados como el límite inferior de confianza del intercepto de la curva de calibración			No se cuenta con los datos experimentales solicitados por el algoritmo. Parámetro no calculado.		

Resultados obtenidos durante el proceso de datos en el caso de estudio	Resultados obtenidos durante el proceso de datos por el algoritmo.
Limite de cuantificación	
0.060 µg/mL calculados como el límite inferior de confianza del intercepto de la curva de calibración	No se cuenta con los datos experimentales solicitados por el algoritmo. Parámetro no calculado.
Precisión del sistema	
promedio=23.04 desviación estándar 0.84 Desviación estándar relativa: 0.366 % El sistema es lineal	promedio=23.04 desviación estándar 0.84 Desviación estándar relativa: 0.366 % El sistema es lineal
Precisión del método (repetibilidad)	
Resultados : Promedio 98.44% desviación estándar = 1.82 Desviación estándar relativa: 1.85%	Resultados : Promedio 98.44% desviación estándar = 1.82 Desviación estándar relativa: 1.85%
Precisión del método (reproducibilidad o precisión intermedia)	
Fcalc (analista)<Ftab 1,8 0.05% Fcalc (día)< Ftab 1/8 0.05% EL METODO ES REPRODUCIBLE POR LOS ANALISTAS Y ENTRE DIAS	Fcalc (analista)<Ftab 1,8 0.05% Fcalc (día)< Ftab 1/8 0.05% EL METODO ES REPRODUCIBLE POR LOS ANALISTAS Y ENTRE DIAS
Robustez	
Proceso experimental no realizado en el caso de estudio	No se cuenta con los datos experimentales solicitados por el algoritmo. Parámetro no calculado.

CAPITULO 7

BIBLIOGRAFIA

1. Braggio S., Barnaby R.J., Grossi P., and Cugola M. A strategy for validation of bioanalytical methods *J. Pharm. Biomed. Anal* 14 (1996) pp. 375-378
2. Brittain Harry G., Validation of Nonchromatographic Analytical Methodology. *Pharmaceutical Technology*, March (1998) pp 82-90
3. Budihandojo Rory. Computerized System Validation: Preparation of a Design Specifications Document. *Pharmaceutical Technology*, March (1998) pp 150-156
4. Buydens L.M.C., Leeuwen van J.A., Vandeginste B.G.M. and Kateman G. Expert systems in Chemical Analysis. *Trends in analytical chemistry* vol 9, no. 2, (1990) pp 49-53.
5. Buydens L.M.C., Leeuwen van J.A., Vandeginste B.G.M. and Kateman G. An expert system for the validation of high performance liquid chromatographic methods. *Trends in analytical chemistry* vol 9, no. 2, (1990) pp 58-62.
6. Castañeda R. Jose Luis. Tesis de Licenciatura: Optimización y Validación de un método analítico para determinar impurezas volátiles orgánicas en sulfametoxazol materia prima para uso farmacéutico UNAM 1997. PP 48-64
7. Ciurczac Emil W. Validation of Spectroscopic Techniques *Pharmaceutical Technology* April (1998) pp 44-48.
8. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos, Guía Oficial de Validación de Métodos Analíticos, 1991 SSA, Canifarma, CNQFB.
9. Conti P., et al. Integrating expert systems for high performance liquid chromatographic method development. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 11(1991) pp 27-35.

10. De Winter Marylene, Grietnes David and Rijckaert Marcel. Process control: a challenge for expert system technology. *Trends in analytical chemistry* vol 9, no. 2, (1990) pp 54-57.
11. Finkelson J. Martin and Guerra Johnny. Validation of analytical methods by FDA laboratories *Pharmaceutical Technology* March (1986) pp 74-84.
12. Firlaj J. V. What is an expert system? En Expert systems technology Elsevier Science Publishers B.V.(1988)
13. Kames H.T., Shiu G, and Shyah V.P. Validation of Bioanalytical Methods. *Pharmaceutical Research* vol 8, no. 4, (1991) pp 421-426
14. Haijian Gerald. Accuracy and precision for analytical results. *Journal of Biopharmaceutical Statistics*, vol 4 no. 1 (1994) pp 31-37.
15. Hokanson C. Gerard. A Life Cycle Approach to the Validation of Analytical Methods during Pharmaceutical Product Development, Part I: The Initial Validation Process. *Pharmaceutical Technology*, september (1994) pp 118-130.
16. Hokanson C. Gerard. A Life Cycle Approach to the Validation of Analytical Methods during Pharmaceutical Product Development, Part II: The Initial Validation Process. *Pharmaceutical Technology*, september (1994) pp 92-100.
17. ICH Food and Drug Administration. Department Of Health and Human Services. International Conference on Harmonisation; Guideline on the Validation of Analytical Procedures: Methodology; Availability; Notice. Federal Register March 1996 vol 60 no 46 pp 9315-9319
18. ICH Food and Drug Administration. Department Of Health and Human Services. International Conference on Harmonisation; Guideline on the Validation of Analytical Procedures: terminology Q2A ; Notice. Federal Register January 1996 vol 60 no 44 pp 27463-27467.

19. ICH Harmonised Tripartite Guideline: Validation of Analytical Procedures: Methodology Topic Q2B Step 4, Consensus Guideline November 1996.
20. Johnson James D. And Van Buskirk Gale E. Analytical Method Validation. *Journal of Validation Technology* vol 2 no. 2 (1996) pp 88-105.
21. Lee Martin L., Taylor Mary and Kantrowitz Julia. Statistical Evaluation of Quality Control Tests. *Pharmaceutical Technology*. September (1988) pp 108-120.
22. Lang J. R. And Bolton S. A comprehensive method validation strategy for bioanalytical applications in the pharmaceutical industry. 1. Experimental Considerations. *Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis*. Vol 9 No. 5 (1991) pp 357-361.
23. Lang J. R. And Bolton S. A comprehensive method validation strategy for bioanalytical applications in the pharmaceutical industry. 2. Statistical analyses. *Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis*. Vol 9 No. 5 (1991) pp 362-367
24. López Trujillo Jorge. Tesis de Licenciatura. Desarrollo y Validación de un método analítico para la identificación y cuantificación de naproxén en tabletas por espectroscopia IR . UNAM Zaragoza. 1996 pp. 43-59
25. Luinge H. J. A knowledge-based system for structure analysis from infrared and mass spectral data. *Trends in Analytical Chemistry* vol 9 no. 2 (1990) pp 66-72.
26. Mulholland M., Dunand N, and Cleland A. Expert System for method validation in chromatography. *Journal of Chromatography* 485 (1989) pp 283-296.
27. Monchy Allan R. De, Forster Alan R., and Arreteig Johnny R. Expert Systems for the Analytical Laboratory. *Analytical Chemistry*, vol 60 no. 23 (1988) pp 1355-1361.
28. Sánchez Aguilar Ma. Dolores. Tesis de Licenciatura: Desarrollo y validación de un método para cuantificación de sulfametazina sódica en materia prima. UNAM Cuautitlán 1998 pp. 59-76

29. Swartz Michael E. and Krull Ira S. Validation of Chromatographic Methods. *Pharmaceutical Technology*, march (1998) pp 104-118.
30. Torbeck Lynn D. Assay Validation: Ruggedness and Robustness with designed experiments. *Pharmaceutical Technology* , march 1996 pp 168-172.
31. Trujeque Garcia Ana Belem Tesis de Licenciatura: Desarrollo de un método analítico para determinación de sulfametazina sódica en materia prima y plasma UNAM Cuautitlán 1998. pp 68-92
32. United States Pharmacopoeia, USP 23 <1225>, Validation of Compendial Methods.
33. Vankeerberghen P. And Massart D.L. Decision trees for rapid prototyping of expert systems. *Trends in Analytical Chemistry*, vol. 10 no. 4 (1991) pp 110-114.
34. Vinod P. Shah et al. Analytical Methods Validation: Bioavailability, Bioequivalence, and Pharmacokinetic Studies. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. Vol. 81, No. 3 march (1992) pp 309-312.
35. W. L. Paul USP Perspective on analytical Methods Validation. *Pharmaceutical Technology*. october (1991) pp. 83-96.
36. Williams S.S. Application of expert systems programming to high performance liquid chromatography method development. *Trends in Analytical Chemistry*, vol. 9 no.2 (1990) pp 63-65.