



Universitat Ramon Llull

TESIS DOCTORAL

Título: Diseño de test de cualificación OQ y PQ en HPLC y desarrollo de modelos de cálculo de la incertidumbre a partir de la validación de procedimientos de análisis.

Realizada por: Manuel Quintela Bermejo

en el Centro: IQS School of Engineering

y en el Departamento: Química Analítica

Dirigida por: Dra. M^a Josefa Blanco Roca y Dr. Francesc Broto Puig

AGRADECIMIENTOS

Primero de todo, gracias a mis dos directores. A Pepa, gracias por todo, por todo lo que me has enseñado y por esas tardes de tantos viernes entre estreses y risas. Sabes que te lo agradezco mucho y eres mucho más para mí que una directora de tesis. Y a ti Francesc por todas esas lecciones cromatográficas y por este gran empujón final. ¡Muchas gracias por todo!

A Lourdes y a todos los miembros de STANG. ¡Donde empezó todo! A Montse, Albert, Mari Carmen, Laura, Felisa por los buenos momentos que pasamos y todo lo que aprendimos juntos! Todos recordaremos aquel croissant de chocolate que manchó aquella manga...

A Judith, por todos esos consejos y ánimos. Y preocuparte de que todo fuera bien! Y todas esas veces que nos hemos chinchado con el fútbol!!!

A la sección de Cromatografía. A Gemma, Cristina, Jordi, Eusebi, Eva, Joel...gracias por ese hueco que me hicisteis en el mundo Cromatográfico.

A mis amigos con los que hemos compartido mesa tanto tiempo: Anna, Tere, Albert! Lo que pudimos llegar a reír en esas comidas! Y Anna aunque ya quedan lejos aquellos viajes de tren si que eran divertidos y todo un recuerdo!

A mis amigos y compañeros de tesis: Ragàs, Berzosa y Kike. Siempre hemos compartido tantas cosas! Y lo seguiremos haciendo! Siempre tan preocupados de que por fin llegase el final! Que os voy a decir a vosotros? Amigos de verdad! También a vuestras mujeres: Carla, Marta y Blanca que sin ellas esto no sería lo mismo! Y a Juanito que con tesis o sin ella siempre estás ahí!

No quiero olvidarme de todos mis alumnos que tuve mientras hacía la tesis! Cuatro cursos inolvidables. Ese sí que es un gran recuerdo que me llevo! Si aquel laboratorio de 3º hablara...

A los padres de Marta y a la Tía Tona! Gracias por preocuparos y por los ánimos!

A Ron y a Nana por esos paseos al bosque para despejarnos. Vosotros si que habéis sido leales y fieles todo este tiempo!

Quiero acordarme también de Xuxa, como te hubiera gustado este momento! Gracias por que sin ti no hubiera llegado hasta aquí! Y de mis abuelos que les hubiera encantado este momento! Sobretudo al abuelo! Aún me acuerdo de aquellas cartas de recomendación!

A mis padres, hermanos y la Tita. Ya no hará falta la pregunta de....Y el doctorado para cuando??? Lo conseguimos! Gracias por todo lo que me habéis dado! Gracias a vosotros estoy aquí!

A mi Martita. Que te voy a decir a ti? Siempre tan animada y alegre sólo contagias ganas y ánimo. Gracias por estar en mi vida. Juntos conseguimos cerrar un nuevo proyecto de los muchos que nos quedan. Te quiero!

SUMARIO

En la presente tesis se han desarrollado y aplicado metodologías para reforzar las bases de la calidad en los laboratorios de análisis, es decir, orientadas a proporcionar datos fiables y válidos para el uso previsto. Estas actividades se han llevado a cabo considerando los requerimientos de los sistemas de calidad ISO 9001, ISO17025, BPL y GMP.

En el primer bloque, se han desarrollado herramientas útiles en la **cualificación de equipos**:

- El **test OQ** (Cualificación Operacional) permite asegurar desde un punto de vista modular el buen funcionamiento de un cromatógrafo de líquidos. Se han utilizado los resultados históricos de confirmación metrológica del equipo para establecer los criterios de aceptación correspondientes.
- El **test PQ** (Cualificación de Ejecución de Proceso) se basa en el análisis de una mezcla de cuatro sustancias. La evaluación de los parámetros establecidos permite comprobar el correcto funcionamiento del cromatógrafo de líquidos desde un punto de vista global o de “caja negra” e, incluso, identificar qué módulo del equipo no está funcionando correctamente.

En el segundo bloque, se ha estudiado la **validación** de procedimientos de análisis y su aplicación en el cálculo de la **incertidumbre** asociada a las medidas.

- Se ha **optimizado** y **revalidado** el procedimiento de análisis de nitrógeno Kjeldahl en muestras de taurina. Las condiciones de trabajo se han modificado, teniendo en cuenta los resultados disponibles de la confirmación metrológica del equipo.
- Se ha desarrollado una metodología para el cálculo de la **incertidumbre** aprovechando los resultados que se obtienen durante la validación de los procedimientos de análisis. Esta metodología se ha aplicado en la determinación de cloruros en lixiviados por HPLC y en la determinación de la distribución de ácidos grasos en muestras de estearato de magnesio por GC.

ÍNDICE

INDICE

GLOSARIO	V
ACRÓNIMOS Y SIGLAS	X
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Sistemas de calidad en laboratorios	2
1.1.1 La Norma ISO 9001	3
1.1.2 La Norma ISO 17025	9
1.1.3 Buenas Prácticas de Laboratorio	16
1.1.4 Normas de Correcta Fabricación	18
1.1.5 El sistema de calidad de IQS-PEINUSA	20
1.2 Calidad de los resultados analíticos	21
1.3 Cualificación de equipos: DQ, IQ, OQ y PQ	24
1.3.1 Las 4 fases de cualificación	24
1.3.2 Actividades para la cualificación	25
1.3.3 Categorías de equipos para su cualificación	28
1.3.4 Cualificación OQ y PQ en HPLC	30
1.4. Validación de procedimientos analíticos y determinación de la incertidumbre	33
1.4.1 Documentación de la validación	33
1.4.2 Parámetros de validación	35
1.4.3 Esquema de validación	41
1.4.4 Revalidación	41
1.4.5 Determinación de la incertidumbre: Método <i>bottom-up</i> (EURACHEM) y Método <i>top-down</i> (<i>Analytical Methods Committee</i>)	43
1.4.6 Estimación de la incertidumbre a partir de los resultados de validación	49
2. OBJETIVOS	55

3. CUALIFICACIÓN DE EQUIPOS EN HPLC	57
3.1. Introducción	58
3.2. Material	59
3.2.1. Equipos	59
3.2.2. Reactivos y patrones	61
3.3. Test OQ	64
3.3.1. Parámetros OQ	64
3.3.2. Secuencia OQ	69
3.3.3. Resultados del test OQ	70
3.3.4. Resumen de resultados	81
3.3.5. Discusión de resultados	82
3.4. Test PQ	84
3.4.1. Parámetros PQ	84
3.4.2. Parámetros relacionados con tiempos de retención	86
3.4.3. Parámetros relacionados con las alturas	90
3.4.4. Secuencia PQ	92
3.4.5. Resultados del test PQ	93
3.4.6. Discusión de resultados	97
4. VALIDACIÓN DE PROCEDIMIENTOS DE ANÁLISIS Y ESTIMACIÓN DE LAS INCERTIDUMBRES DE MEDIDA	99
4.1. Introducción	100
4.2. Material	101
4.2.1. Equipos	101
4.2.2. Reactivos y patrones	105

4.3. Optimización y revalidación del procedimiento de análisis de nitrógeno Kjeldahl en muestras de taurina	108
4.3.1. Análisis de taurina	108
4.3.2. Método inicial	113
4.3.3. Optimización del método	114
4.3.4. Revalidación	115
4.3.5. Discusión de resultados	117
4.4. Validación del procedimiento de análisis de cloruros por HPLC en muestras de lixiviado y estimación de la incertidumbre de los resultados	118
4.4.1. Procedimiento de análisis	118
4.4.2. Validación	121
4.4.3. Incertidumbre	126
4.4.4. Discusión de resultados	132
4.5. Validación del procedimiento de análisis de ácidos palmítico y esteárico por GC en muestras de estearato de magnesio y estimación de la incertidumbre de los resultados	134
4.5.1. Procedimiento de análisis	134
4.5.2. Validación	137
4.5.3. Incertidumbre	139
4.5.4. Discusión de resultados	144
CONCLUSIONES	146
BIBLIOGRAFÍA	150
ANEXOS	159

GLOSARIO

ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD

Parte de la gestión de la calidad orientada a proporcionar confianza en que se cumplirán los requisitos de la calidad.

CALIBRACIÓN

Es el conjunto de operaciones que establecen, en condiciones especificadas, la relación entre los valores de una magnitud indicados por un instrumento de medida o un sistema de medida, o los valores representados por una medida materializada o por un material de referencia, y los valores correspondientes de esa magnitud obtenidos con patrones.

CALIDAD

Grado en el que un conjunto de características inherentes cumple con los requisitos.

COEFICIENTE DE VARIACIÓN

Es la desviación estándar expresada en función de la media. Se calcula dividiendo la desviación estándar entre el promedio de los resultados y acostumbra a expresarse en porcentaje.

CONFIRMACIÓN METROLÓGICA

Conjunto de operaciones necesarias para asegurar que el equipo de medición cumple con los requisitos para su uso previsto. Generalmente incluye calibración y/o verificación, cualquier ajuste necesario o reparación y posterior recalibración, comparación con los requisitos metrológicos para el uso previsto del equipo de medición, así como cualquier sellado y etiquetado requeridos.

CONTROL DE LA CALIDAD

Parte de la gestión de la calidad orientada al cumplimiento de los requisitos de la calidad.

CUALIFICACIÓN

Demostración de forma documentada que el equipo funciona correctamente para el uso previsto y que está debidamente calibrado.

DESVIACIÓN ESTANDAR

Denotada con el símbolo σ o s es un parámetro estadístico indicativo de la variabilidad o dispersión de resultados. Se define como la raíz cuadrada de la varianza de la variable.

EQUIPOS DE MEDIDA DIRECTA

Se consideran equipos de medida directa los que miden magnitudes físicas y el valor generado se expresa en la misma magnitud que mide el equipo.

EQUIPOS DE MEDIDA COMPARATIVA

Se consideran equipos de medida indirecta los que la medida física que se realiza con el equipo está relacionada con la magnitud problema mediante una función.

ERROR SISTEMÁTICO

Componente del error de medida, que en mediciones repetidas, permanece constante o varía de manera predecible.

ERROR ALEATORIO

Componente del error de medida, que en mediciones repetidas, varía de manera impredecible.

EXACTITUD

Expresa la proximidad del valor obtenido frente a un valor considerado verdadero y aporta información de los errores sistemáticos del procedimiento.

GESTIÓN DE LA CALIDAD

Actividades coordinadas para dirigir y controlar una organización en lo relativo a la calidad. Generalmente incluye el establecimiento de la política de la calidad, los objetivos de la calidad, la planificación de la calidad, el control de la calidad, el aseguramiento de la calidad y la mejora de la calidad.

INCERTIDUMBRE

La incertidumbre es el parámetro asociado al resultado de una medida que caracteriza la dispersión de los valores que podrían ser razonablemente atribuidos al mesurando.

LIMITE DE CUANTIFICACIÓN

Se define como la mínima cantidad de analito presente en la muestra que se puede cuantificar, bajo las condiciones experimentales descritas, con una adecuada precisión y exactitud.

LIMITE DE DETECCIÓN

Mínima cantidad de analito en la muestra que se puede detectar, aunque no necesariamente cuantificar. Es un parámetro cualitativo

LINEALIDAD

Capacidad de obtener una respuesta directamente proporcional a la concentración del analito, en un determinado intervalo de concentraciones.

MANTENIMIENTO

Conjunto de actividades basadas en la limpieza, recambio de alguna pieza y reajuste del equipo.

MATERIAL DE REFERENCIA

Material suficientemente homogéneo y estable con respecto a propiedades especificadas, establecido como apto para su uso previsto en una medición o en un examen de propiedades cualitativas.

POLÍTICA DE LA CALIDAD

Intenciones globales y orientación de una organización relativas a la calidad tal como se expresan formalmente por la alta dirección.

PRECISION

Grado de dispersión de una serie de resultados, obtenidos a partir de múltiples repeticiones de una misma muestra homogénea en las condiciones descritas en el método.

SATISFACCIÓN DEL CLIENTE

Percepción del cliente sobre el grado en que se han cumplido sus requisitos.

SELECTIVIDAD

Capacidad de un método para medir y/o identificar simultánea o separadamente los analitos de interés de forma inequívoca sin interferencias de impurezas u otras sustancias presentes en la matriz de la muestra.

TRAZABILIDAD

Capacidad para seguir la historia, la aplicación o la localización de todo aquello que está bajo consideración.

VALIDACIÓN

Validar un procedimiento de análisis es demostrar de forma documentada que el procedimiento analítico conducirá con un alto grado de seguridad a la obtención de resultados adecuados conforme a los requisitos previamente establecidos.

VERIFICACIÓN

Consiste en revisar, inspeccionar, ensayar, comprobar, supervisar, o realizar cualquier otra función que establezca y documente que los elementos, procesos, servicios o documentos están conformes con los requisitos especificados. Puede decirse que la verificación es una calibración “relativa” ya que no se está tan interesado en el resultado final como en saber si, a partir de ese resultado, se cumplen o no unos requisitos especificados.

ACRÓNIMOS Y SIGLAS

AEFI: Asociación Española Farmacéuticos de la Industria
AENOR: Asociación Española de Normalización y Certificación
AMC: Analytical Methods Committee
AOAC: Asociación de Químicos Analíticos Oficiales
BPL: Buenas Prácticas de Laboratorio
CV: Coeficiente de Variación:
DAlta: Disolución a concentración alta
DBaja: Disolución a concentración baja
ENAC: Entidad Nacional de Acreditación
DQ: Cualificación de Diseño
FM: Fase móvil
FR: Factor de respuesta
GC: Cromatografía de gases
GMP: Normas de Correcta Fabricación
HPLC: Cromatografía Líquida de Alta Resolución
k: Factor de retención
LA: Límite de Aceptación
LC: Límite de Cuantificación
LD: Límite de Detección
ICH: Conferencia Internacional de Armonización
IQ: Cualificación de Instalación
OQ: Cualificación Operacional
PNT: Procedimiento Normalizado de Trabajo
PQ: Cualificación de Proceso
QCs: Controles de Calidad
Rs: Resolución
s: Desviación estándar
SST: Test de idoneidad
tr: Tiempo de retención
USP: Farmacopea de Estados Unidos

1. INTRODUCCIÓN

1.1. SISTEMAS DE CALIDAD EN LABORATORIOS

El sistema de gestión de la calidad es aquella parte del sistema de gestión de la organización enfocada en el logro de resultados, en relación con los objetivos de la calidad, para satisfacer las necesidades, expectativas y requisitos de las partes interesadas [UNE-EN ISO 9000:2005]. Se trata de una serie de actividades coordinadas, que se llevan a cabo sobre un conjunto de elementos (recursos, procedimientos, documentos, estructura de la organización y estrategias) para lograr la calidad de los productos o servicios que se ofrecen al cliente. Es decir, planificar, controlar y mejorar aquellos elementos de una organización que influyen en la satisfacción del cliente y en el logro de los resultados deseados por la organización. Por tanto, se considera que un sistema de gestión de la calidad es una estructura operacional de trabajo, bien documentada e integrada a los procedimientos técnicos y gerenciales, para guiar las acciones de la fuerza de trabajo, la maquinaria o equipos, y la información de la organización de manera práctica y coordinada. Esta estructura se orienta a asegurar la satisfacción del cliente, intentando minimizar los costos de la calidad. El sistema de gestión de la calidad establece la política y los objetivos que permiten dirigir y controlar una organización con respecto a la calidad.

Los principales sistemas de calidad que se aplican en los laboratorios de análisis químico son: ISO 9001, ISO 17025, Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL o GLP) y Normas de Correcta Fabricación (NCF o GMP).

Es importante destacar que la implantación de un sistema de gestión de calidad en una organización no sólo supone la comprensión y reflejo de unas determinadas normas, sino también el conocimiento de que hace dicha organización. Por ejemplo, cuando se elabora un procedimiento que hay que implementar para cumplir un determinado requisito de calidad, es necesario considerar que las nuevas actividades a realizar sean compatibles con el resto de la organización y de esta manera garantizar que se mantendrá su buen funcionamiento.

1.1.1 La Norma ISO 9001

La Norma ISO 9001 elaborada por la Organización Internacional para la Estandarización (ISO, International Organization for Standardization), determina los requisitos para un Sistema de Gestión de la Calidad (SGC) que pueden utilizarse por las organizaciones para su aplicación interna y certificación, sin importar si el producto o servicio lo brinda una organización pública o empresa privada, cualquiera que sea su tamaño [UNE-EN ISO 9001:2008].

La primera serie de normas ISO 9000 se publicó en 1987, pero fue la versión de 1994 la que logró una gran difusión. Con ella, se produjo la internacionalización de las normas y de los sistemas de calidad, inicialmente centrados en los sectores industriales y posteriormente, junto con el desplazamiento de la economía mundial hacia el sector de los servicios, se extendió también a este último.

La versión ISO 9001:2000 incorporó como principales novedades un cambio de orientación, ampliando el cumplimiento de requisitos a la satisfacción del cliente. Además, se pasa de un enfoque basado en la estabilidad centrada en el ciclo productivo a la mejora continua de la totalidad de la organización mediante la gestión por procesos [Báguena, 2008].

Es decir, en la norma ISO 9001:2000 aparecen las principales características, que actualmente se consideran intrínsecas a la implementación de un sistema de gestión de la calidad:

- Compatibilidad con otros sistemas de gestión, tales como aquellos particulares para la gestión ambiental, gestión de la seguridad y salud ocupacional, gestión financiera o gestión de riesgos.
- Enfoque basado en procesos. Es decir, identificación de un sistema de procesos dentro de la organización y sus interacciones, así como su gestión para producir el resultado deseado.

- Mejora continua. La organización debe mejorar continuamente la eficacia del sistema de gestión de la calidad mediante el uso de la política de la calidad, los objetivos de la calidad, los resultados de las auditorías, el análisis de datos, las acciones correctivas y preventivas y la revisión por la dirección.

La metodología para la mejora continua (Ciclo PDCA) está basada en cuatro etapas (ver Figura 1.1):

- Planificar (Plan): Establecer los objetivos y procesos para alcanzar los resultados.
- Hacer (Do): Implementar los procesos.
- Verificar (Check): Realizar el seguimiento y la medición de procesos y productos.
- Actuar (Act): Tomar acciones para mejorar continuamente el desempeño de los procesos.

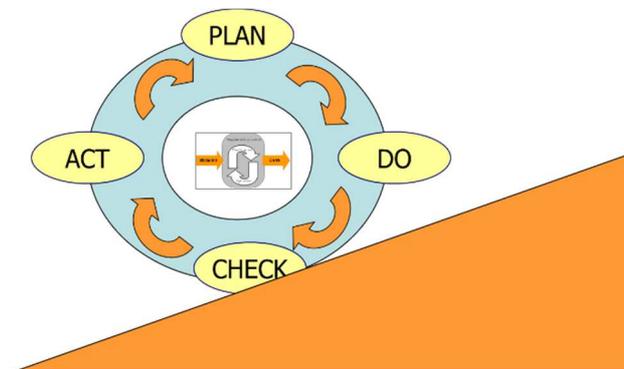


Figura 1.1. Ciclo PDCA de mejora continua [Báguena, 2008].

La versión de la norma ISO 9001:2008 introdujo pocos cambios respecto a la versión del 2000, especificando los requisitos para un sistema de gestión de la calidad cuando una organización:

- Necesita demostrar su capacidad para proporcionar regularmente productos que satisfagan los requisitos del cliente y los legales y reglamentarios aplicables, y

- Aspira a aumentar la satisfacción del cliente a través de la aplicación eficaz del sistema, incluidos los procesos para la mejora continua del sistema y el aseguramiento de la conformidad con los requisitos del cliente y los legales y reglamentarios aplicables.

La Norma ISO 9001:2008 se estructura en los siguientes apartados:

0. Introducción

1. Objeto y campo de aplicación

1.1 Generalidades

1.2 Aplicación

2. Referencias normativas

3. Términos y definiciones

4. Sistema de gestión de la calidad

4.1 Requisitos generales

4.2 Requisitos de la documentación

5. Responsabilidad de la dirección

5.1 Compromiso de la dirección

5.2 Enfoque al cliente

5.3 Política de calidad

5.4 Planificación

5.5 Responsabilidad, autoridad y comunicación

5.6 Revisión por la dirección

6. Gestión de los recursos

6.1 Provisión de recursos

6.2 Recursos humanos

6.3 Infraestructura

6.4 Ambiente de trabajo

7. Realización del producto

7.1 Planificación de la realización del producto

7.2 Procesos relacionados con el cliente

7.3 Diseño y desarrollo

7.4 Compras

7.5 Producción y prestación del servicio

7.6 Control de los equipos de seguimiento y de medición

8. Medición análisis y mejora

8.1 Generalidades

8.2 Seguimiento y medición

8.3 Control de análisis de datos

8.4 Análisis de datos

8.5 Mejora

La norma se encuentra nuevamente en proceso de revisión y se espera la publicación de la versión de la norma ISO 9001:2015, a finales del presente año 2015. Aparecerán nuevos conceptos (liderazgo, información documentada, gestión de riesgos y gestión del cambio, entre otros) y una nueva estructura común a todos los sistemas de gestión. Esta Estructura de Alto Nivel o HLS se presenta a continuación:

1. Objeto y campo de aplicación
2. Referencias normativas
3. Términos y definiciones
4. Contexto de la organización
5. Liderazgo
6. Planificación para el sistema de gestión de la calidad
7. Soporte
8. Operación
9. Evaluación del desempeño
10. Mejora

De especial interés para la presente tesis son los conceptos sobre los equipos de medición, tal y como se definen en la norma ISO 9000:2005 y se aplican en la ISO 9001:2008.

La serie ISO 9001 define confirmación metrológica como el conjunto de operaciones necesarias para asegurar, de forma documentada, que el equipo de medición cumple con los requisitos para su uso previsto (rango, resolución, errores máximos permisibles, etc.). Estas actividades incluyen la calibración y verificación de equipos, así como cualquier ajuste necesario o reparación y posterior recalibración [UNE-EN ISO 9001:2008].

En relación al **control de los equipos de medición**, se indica:

La organización debe establecer procesos para asegurarse de que el seguimiento y medición pueden realizarse y se realizan de una manera coherente con los requisitos de seguimiento y medición.

Cuando sea necesario asegurarse de la validez de los resultados, el equipo de medición debe:

- a) calibrarse o verificarse, o ambos, a intervalos especificados o antes de su utilización, comparado con patrones de medición trazables a patrones de medición internacionales o nacionales; cuando no existan tales patrones debe registrarse la base utilizada para la calibración o la verificación;*
- b) ajustarse o reajustarse según sea necesario;*
- c) estar identificado para poder determinar su estado de calibración;*
- d) protegerse contra ajustes que pudieran invalidar el resultado de la medición;*
- e) protegerse contra los daños y el deterioro durante la manipulación, el mantenimiento y el almacenamiento.*

Además, la organización debe evaluar y registrar la validez de los resultados de las mediciones anteriores cuando se detecte que el equipo no está conforme con los requisitos. La organización debe tomar las acciones apropiadas sobre el equipo y sobre cualquier producto afectado.

Deben mantenerse registros de los resultados de la calibración y la verificación.

En la fiabilidad de los resultados obtenidos con un equipo, la confirmación metrológica juega un papel fundamental, pues permite garantizar el correcto funcionamiento de los equipos de medida para asegurar que cumplen con los requisitos establecidos durante la vida útil del equipo:

- La calibración de un equipo de medida permite definir la función o factor de respuesta del equipo así como la incertidumbre asociada a las medidas.
- Las actividades de verificación de los equipos de medida están basadas en la comparación frente a especificaciones.
- El mantenimiento (preventivo/correctivo) está basado en la limpieza, recambio de algún componente y reajustes de los equipos.

La Figura 1.2 presenta de forma esquemática las actividades necesarias para garantizar la fiabilidad de los resultados obtenidos por un equipo durante su ciclo de vida. En la tesis doctoral de Judith Báguena Polo se desarrollan y aplican estas actividades a equipos de medida directa y medida comparativa (por ejemplo, balanzas y cromatógrafos, respectivamente) [Báguena, 2008].

Además, para asegurar el correcto uso de los equipos y la protección contra ajustes incontrolados, es necesario garantizar que la manipulación de los equipos la realiza personal debidamente autorizado y cualificado. Esta cualificación incluye el uso de equipos y las operaciones de confirmación metrológica de calibración, verificación y mantenimiento.

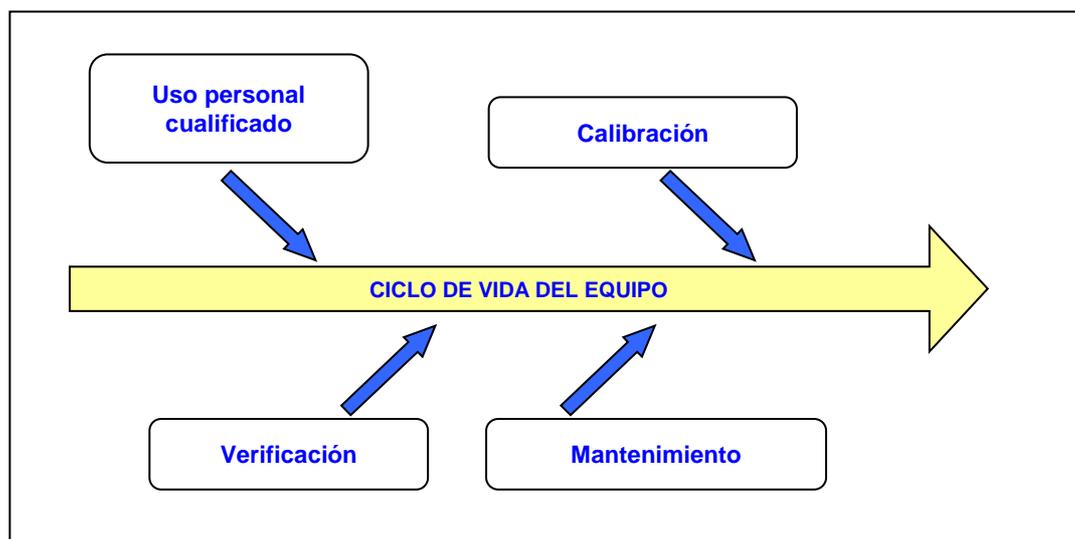


Figura 1.2. Ciclo de vida de un equipo [Báguena, 2006].

1.1.2 La Norma ISO 17025

La Norma ISO 17025 es una normativa internacional desarrollada por ISO en la que se establecen los requisitos que deben cumplir los laboratorios de ensayo y calibración. Aunque esta norma tiene muchos aspectos en común con la norma ISO 9001, se distingue de la anterior en que aporta como principal objetivo la acreditación de la competencia de las entidades de ensayo y calibración, por las entidades de acreditación correspondientes (ENAC, en España) [UNE-EN ISO/IEC 17025:2005].

La Norma ISO 17025:2005 se estructura en los siguientes apartados:

- Requisitos relativos a la gestión:
 1. Organización
 2. Sistema de gestión
 3. Control de los documentos
 4. Revisión de los pedidos, ofertas y contratos
 5. Subcontratación de ensayos y de calibraciones
 6. Compras de servicios y suministros
 7. Servicios al cliente
 8. Quejas
 9. Control de trabajos de ensayos o de calibraciones no conformes
 10. Mejora
 11. Acciones correctivas
 12. Acciones preventivas
 13. Control de los registros
 14. Auditorías internas
 15. Revisiones por la dirección

- Requisitos técnicos:
 1. Generalidades
 2. Personal
 3. Instalaciones y condiciones ambientales
 4. Métodos de ensayo y de calibración y validación de métodos

5. Equipos
6. Trazabilidad de las mediciones
7. Muestreo
8. Manipulación de los ítems de ensayo o de calibración
9. Aseguramiento de la calidad de los resultados de Ensayo y calibración
10. Informe de los resultados

Esta norma se aplica por los laboratorios de ensayo y calibración con el objetivo de demostrar que son técnicamente competentes y de que son capaces de producir resultados técnicamente válidos.

Los laboratorios de ensayo y calibración que cumplan esta norma actuarán también de acuerdo con la Norma ISO 9001. Pero la conformidad con los requisitos de la Norma ISO 9001 no constituye por sí sola una prueba de la competencia del laboratorio para producir datos y resultados técnicamente válidos.

Las diferencias más relevantes entre acreditación y certificación están relacionadas con el objetivo y el contenido de las normas (<http://www.enac.es>, 2014):

- **Acreditación:** un organismo autorizado (Entidad Nacional de Acreditación, ENAC) reconoce formalmente que una organización es competente para realizar una tarea concreta. Los requisitos específicos de las actividades a realizar se encuentran en normas, como la ISO 17025.
- **Certificación:** una tercera parte (por ejemplo AENOR) garantiza que un producto, proceso o servicio es conforme con unos requisitos concretos. Estos requisitos se recogen en normas genéricas que aplican a cualquier tipo de organización, como la ISO 9001.

En España, ENAC acredita a los laboratorios de ensayo y calibración según la norma ISO 17025. Si este laboratorio además está certificado según la norma ISO 9001, su certificación la habrá realizado una entidad de certificación de sistemas de gestión acreditada por ENAC según indica la norma UNE-EN ISO/IEC 17021. La Figura 1.3 presenta de forma esquemática la correspondencia entre acreditación y certificación.

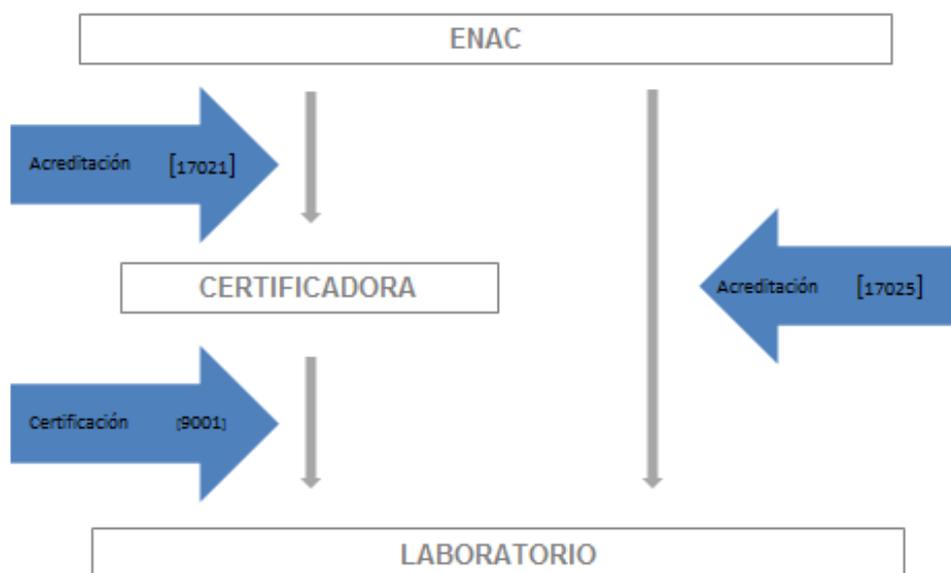


Figura 1.3. Acreditación vs certificación.

De especial interés en la presente tesis son los conceptos en relación a la validación de métodos de ensayo y la estimación de la incertidumbre de la medición, tal y como y se presentan en la norma ISO 17025:2005:

La validación es la confirmación, a través del examen y el aporte de evidencias objetivas, de que se cumplen los requisitos particulares para un uso específico previsto.

El laboratorio debe validar los métodos no normalizados, los métodos que diseña o desarrolla, los métodos normalizados empleados fuera del alcance previsto, así como las ampliaciones y modificaciones de los métodos normalizados, para confirmar que los métodos son aptos para el fin previsto. La validación debe ser tan amplia como sea necesario

para satisfacer las necesidades del tipo de aplicación o del campo de aplicación dados. El laboratorio debe registrar los resultados obtenidos, el procedimiento utilizado para la validación y una declaración sobre la aptitud del método para el uso previsto. La gama y la exactitud de los valores que se obtienen empleando métodos validados (por ejemplo, la incertidumbre de los resultados, el límite de detección, la selectividad del método, la linealidad, el límite de repetibilidad o de reproducibilidad, la robustez ante influencias externas o la sensibilidad cruzada frente a las interferencias provenientes de la matriz de la muestra o del objeto de ensayo) tal como fueron fijadas para el uso previsto, deben responder a las necesidades de los clientes.

Y en relación a la estimación de la incertidumbre de la medición:

Un laboratorio de calibración, o un laboratorio de ensayo que realiza sus propias calibraciones, debe tener y debe aplicar un procedimiento para estimar la incertidumbre de la medición para todas las calibraciones y todos los tipos de calibraciones.

Los laboratorios de ensayo deben tener y deben aplicar procedimientos para estimar la incertidumbre de la medición. En algunos casos la naturaleza del método de ensayo puede excluir un cálculo riguroso, metrológicamente y estadísticamente válido, de la incertidumbre de medición. En estos casos, el laboratorio debe, por lo menos, tratar de identificar todos los componentes de la incertidumbre y hacer una estimación razonable, y debe asegurarse de que la forma de informar el resultado no dé una impresión equivocada de la incertidumbre. Una estimación razonable se debe basar en un conocimiento del desempeño del método y en el alcance de la medición y debe hacer uso, por ejemplo, de la experiencia adquirida y de los datos de validaciones anteriores.

Cuando se estima la incertidumbre de la medición, se deben tener en cuenta todos los componentes de la incertidumbre que sean de importancia en la situación dada, utilizando métodos apropiados de análisis. Las fuentes que contribuyen a la incertidumbre incluyen, pero no se limitan necesariamente, a los patrones de referencia y los materiales de referencia utilizados, los métodos y los equipos utilizados, las condiciones ambientales, las propiedades y la condición del ítem sometido al ensayo o la calibración, y al operador.

En la tesis doctoral de Judith Báguena Polo y en el Trabajo de Final de Carrera de Gemma Gotor Navarra se realiza una recopilación exhaustiva de la abundante bibliografía acerca de la validación de métodos analíticos. La Tabla 1.1.a y la Tabla 1.1.b detallan diferentes organismos y guías de validación, según sectores. En los **protocolos de validación** diseñados se consideran los siguientes parámetros: selectividad, linealidad, exactitud, precisión, límite de cuantificación y la estimación de la incertidumbre [Báguena, 2008; Gotor, 2008].

Sector	Organismo	Guías de validación
General	AENOR Asociación Española de Normalización y Certificación	Norma ISO 5725 (<i>Precisión y exactitud</i>) ⁽¹⁾
	AOAC <i>American Association of Official Analytical Methods</i>	<i>Validation guides</i> ^(2,3)
	EURACHEM	<i>The Fitness for Purpose of Analytical Methods: A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics</i> ⁽⁴⁾
	IUPAC / AOAC / FAO / IAEA <i>IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry</i> <i>IAEA: International Atomic Energy Agency</i>	<i>Principles and Practices of Method Validation</i> ⁽⁵⁾
Farmacéutico	ICH <i>International Conference on Harmonisation</i>	<i>Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1)</i> ⁽⁶⁾
	AEFI Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria	Monografías de AEFI <i>Validación de métodos analíticos</i> ⁽⁷⁾
	EP <i>European Pharmacopoeia</i>	Capítulo general <i>General Notices apply to all monographs and other text</i> ⁽⁸⁾
	USP <i>United States Pharmacopoeia</i>	Capítulo general <i>Validación de procedimientos farmacopeicos</i> ⁽⁹⁾
	FDA <i>Food and Drug Administration</i>	<i>Guidance for Industry Guidance. Validation of analytical. Procedures: Methodology</i> ^(10,11)
Medio ambiental	EPA <i>Environmental Protection Agency</i>	<i>Guidance for methods development and methods validation for the RCRA program</i> ⁽¹²⁾
Fitosanitarios	CIPAC <i>Commission Internationale des Méthodes d'Analyse des Pesticides</i>	<i>Guidelines on method validation to be performed in support of analytical methods for agrochemical formulations</i> ⁽¹³⁾
Alimentario	FAO <i>Food and Agriculture Organization</i>	<i>Guidance for Industry. Bioanalytical method validation</i> ⁽¹⁴⁾

Tabla 1.1.a. Organismos y guías de validación [Báguena, 2008; Gotor, 2008].

(1)	ISO 5725-1:1994. Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results - Part 1: General principles and definitions. 1994.
(2)	AOAC Oficial Methods of Analysis. Appendix D: Guidelines for collaborative Study Procedures to Validate Characteristics of a Method of Analysis. 2002.
(3)	AOAC Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals. 2002.
(4)	EURACHEM Guide. The Fitness for Purpose of Analytical Methods: A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. 1998.
(5)	AOAC/FAO/IAEA/IUPAC. Principles and Practices of Method Validation. The Royal Society of Chemistry, 2000.
(6)	ICH Harmonised Tripartite Guideline. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1). Noviembre 2005.
(7)	Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (AEFI). Validación de Métodos Analíticos. Monografía de AEFI, Gispert, La Bisbal (Girona), 2001
(8)	European Pharmacopeia 5.0. 2.2.46. Chromatographic separation technique. General Notices apply to all monographs and other texts, p. 69–73.
(9)	USP 30 <1225>. Validación de procedimientos farmacopeicos. Información general.
(10)	Guidance for Industry. Validation of analytical procedures: Definition and Terminology. U.S. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration Center for Veterinary Medicine, 1999.
(11)	Guidance for Industry. Validation of analytical procedures: Methodology. U.S. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration Center for Veterinary Medicine, 1999.
(12)	Guidance for methods development and methods validation for the RCRA program. 1992.
(13)	Guidelines on method validation to be performed in support of analytical methods for agrochemical formulations. CIPAC 3807.
(14)	Guidance for Industry. Bioanalytical method validation. FAO. 2001. U.S. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration.

Tabla 1.1.b. Referencias incluidas en la Tabla 1.1.a. [Báguena, 2008; Gotor, 2008].

1.1.3 Buenas Prácticas de Laboratorio

Los principios de las **Buenas Prácticas de Laboratorio (Good Laboratory Practices, GLP)** son utilizados para realizar estudios destinados a obtener los datos sobre las propiedades y peligrosidad para las personas, los animales y el medio ambiente de cualquier sustancia química. El fin de estos estudios es su presentación ante las autoridades reguladoras competentes para el registro oficial de las sustancias estudiadas, paso previo para su comercialización. Son estudios no clínicos de seguridad sanitaria y medioambiental realizados, por tanto, con fines reglamentarios [ENAC, 2014].

Los estudios cubiertos por las GLP se clasifican en cuatro grandes grupos en función de su objetivo:

- Estudios de propiedades físico-químicas.
- Estudios toxicológicos, diseñados para evaluar efectos sobre la salud humana.
- Estudios ecotoxicológicos sobre organismos acuáticos o terrestres, diseñados para evaluar efectos sobre el medioambiente.
- Estudios ecológicos sobre su comportamiento en el agua, suelo y aire o la bioacumulación: diseñados para evaluar el destino y comportamiento medioambiental.

ENAC certifica el cumplimiento de Buenas Prácticas de Laboratorio en relación a:

- Sustancias químicas industriales
- Fitosanitarios

El Ministerio de Sanidad y Consumo, a través de la Agencia Española del Medicamento, mantiene, entre otras, las siguientes áreas de certificación [Ministerio de Sanidad y Consumo, 2014].

- pruebas físico-químicas
- estudios de toxicidad
- estudios de mutagenicidad
- pruebas analíticas y de química clínica

El Real Decreto 1369/2000, que establece los principios de las buenas prácticas de laboratorio y su aplicación en la realización de estudios no clínicos sobre sustancias y productos químicos, se estructura en los siguientes apartados [Real Decreto 1369/2000]:

1. Organización y personal del laboratorio
2. Programa de garantía de calidad
3. Instalaciones
4. Aparatos, materiales y reactivos
5. Sistemas experimentales (físicos, químicos y biológicos)
6. Productos de ensayo y de referencia
7. Procedimientos normalizados de trabajo
8. Realización del estudio
9. Información de los resultados del estudio
10. Archivo y conservación de registros y materiales

Las GLP proporcionan pautas recomendadas para la gestión de los estudios y representan un sistema de calidad relacionado con los procesos organizativos y las condiciones bajo las cuales los estudios son planificados, realizados, controlados, registrados, archivados e informados, para garantizar la calidad y validez de los datos obtenidos.

La asignación de responsabilidades en una entidad de ensayo GLP condiciona las actividades que deben realizar algunas funciones de la organización. En particular, es responsabilidad de la Dirección del Laboratorio asegurar que se establecen y se siguen procedimientos normalizados de trabajo apropiados y técnicamente válidos; aprobando todos los procedimientos normalizados de trabajo, tanto originales como revisiones.

En relación a los equipos de medida, el Real Decreto 1369/2000 indica:

Los aparatos, incluidos los sistemas informatizados validados, utilizados para la obtención, almacenamiento y recuperación de datos, y para el control de factores medioambientales relevantes para el estudio, deberán estar debidamente ubicados y contar con el diseño y la capacidad adecuados.

Los aparatos utilizados en un estudio deberán ser examinados, limpiados, mantenidos y calibrados periódicamente, siguiendo procedimientos normalizados de trabajo. Cada una de estas actividades deberá registrarse debidamente. La calibración deberá, en su caso, ser trazable a patrones de medida nacionales o internacionales.

Desde un punto de vista técnico no se introducen nuevas aportaciones, respecto a las consideraciones realizadas anteriormente, en los apartados ISO 9001 e ISO 17025. Sin embargo, teniendo en cuenta una posible integración de sistemas, hay que destacar que la persona o personas responsables del programa de garantía de calidad no podrán estar involucradas en la realización del estudio que deban asegurar, y esto incluye la realización de calibraciones relacionadas.

1.1.4 Normas de Correcta Fabricación

Las **Normas de Correcta Fabricación (Good Manufacturing Practices, GMP)** son las prácticas que se requieren con el fin de ajustarse a las directrices recomendadas por los organismos que controlan la autorización y concesión de licencias para la fabricación y venta de productos farmacéuticos y productos farmacéuticos activos [Eudralex].

Estas directrices proporcionan los requisitos mínimos para asegurar que los productos son de alta calidad y no suponen ningún riesgo para el consumidor o público. Las GMP permiten minimizar los riesgos para la calidad del producto, que no pueden ser eliminados simplemente controlando la calidad del producto final. Los riesgos principales son:

- Contaminación inesperada de productos, provocando riesgos para la salud.
- Etiquetas incorrectas en los envases, que podrían significar que los pacientes reciban el medicamento de forma incorrecta.
- Principios activos dosificados en defecto o en exceso, produciendo respectivamente tratamientos pocos eficaces o nocivos/tóxicos.

Las GMP vigentes se encuentran disponibles en las webs oficiales de los organismos reguladores y se estructuran en los siguientes capítulos [ECA, 2014]:

1. Sistema de calidad Farmacéutico
2. Personal
3. Locales y equipos
4. Documentación
5. Producción
6. Control de calidad
7. Fabricación y análisis por contrato (Subcontrataciones)
8. Reclamaciones y retirada de productos
9. Autoinspección

Las GMP cubren todo el proceso de la producción: materias primas, equipos, formación e higiene del personal, procedimientos para cada proceso que podría afectar la calidad del producto final. Los registros realizados permiten garantizar que los procedimientos de trabajo han sido aplicados consistentemente a lo largo de todo el proceso de fabricación. De esta manera, se estará en disposición de asegurar la homogeneidad de un lote de producción, no sólo respecto de otros lotes, sino dentro del mismo.

Un laboratorio que realice análisis físico-químicos podrá ser subcontratado, para llevar a cabo actividades de control de calidad de materias primas, de productos intermedios o de productos acabados, si garantiza que cumple con los requerimientos GMP. Esto, en último término conlleva la certificación por la

Agencia Española del Medicamento y el registro del laboratorio como laboratorio farmacéutico para la realización de análisis de control de calidad.

1.1.5. El sistema de calidad de IQS-PEINUSA

Desde el año 1963 el IQS viene prestando Servicios de Asistencia y Asesoramiento a las Industrias, Empresas y Administraciones a través de contratos de investigación, asesorías y análisis industriales. Para la comercialización de dichos servicios se creó la Promotora de Enlace Industria y Universidad, S.A. (PEINUSA) que es la responsable directa de mantener los contactos con los clientes actuales y futuros. PEINUSA es una sociedad anónima unipersonal de la fundación IQS.

El IQS dispone de la certificación por AENOR según la norma ISO 9001 desde el año 2000 y además ha ido obteniendo acreditaciones por ENAC según la norma ISO 17025 para análisis de dioxinas y furanos en emisiones atmosféricas y alimentos y ensayos físico-químicos en aguas, residuos y lixiviados. Además, desde 2011 se dispone de la certificación BPL para la realización de estudios de sustancias químicas en las áreas de ensayo de la caracterización físico-química, biodegradabilidad y demanda química de oxígeno.

En este contexto, y para adaptarse a las necesidades de sus clientes, los laboratorios de IQS-PEINUSA llevan incorporando requisitos GMP en su sistema de calidad y la presente tesis refuerza esta línea de actuación, especialmente en relación a la cualificación de equipos y a la validación de procedimientos de análisis.

1.2. CALIDAD DE LOS RESULTADOS ANALÍTICOS

Uno de los principales objetivos un laboratorio de análisis es el de proporcionar datos fiables y válidos para el uso previsto. Independientemente del sistema de calidad considerado, y teniendo en cuenta la creciente sofisticación y automatización de la instrumentación analítica, se puede considerar que la generación de resultados analíticos fiables y consistentes implica de forma crítica a cuatro componentes [Bansal et al., 2004]:

- La cualificación de equipos.
- La validación de métodos analíticos.
- Los test de idoneidad (*System Suitability Test, SST*).
- Los controles de calidad (*Quality Control check samples, QCs*).

Estos componentes, o tipos de actividad, se superponen en capas conformando una pirámide de calidad (ver Figura 1.4), en el que cada capa añade valor a la calidad final de los resultados [USP 34-NF 29 (b), 2011].



Figura 1.4. Componentes de la calidad de los datos [USP 34-NF 29 (b), 2011].

Burguess destaca que un enfoque “*bottom up*”, encadenando de abajo a arriba las actividades, es el único que permitirá disponer de datos fiables. Y con ello, se favorecerá la obtención de información y toma de decisiones a partir de los datos de calidad [Burguess et al., 1998].

- La cualificación de equipos es la colección de pruebas documentadas de que un equipo funciona adecuadamente para su uso previsto y que ha sido convenientemente mantenido y calibrado. El uso de un instrumento cualificado en los análisis contribuye a la confianza en la validez/veracidad de los datos generados.
- La validación de métodos analíticos es la colección de evidencias documentadas de que un procedimiento analítico es adecuado para su uso previsto, de acuerdo con los requisitos establecidos. La utilización de procedimientos analíticos validados, con equipos cualificados, proporciona confianza en que el procedimiento puede generar datos analíticos de calidad aceptable.
- El test de idoneidad verifica que el sistema funcionará de acuerdo con los criterios establecidos en el procedimiento de análisis. Estas pruebas típicamente se realizan justo antes del análisis de las muestras para asegurar que el sistema funciona correctamente en el momento del análisis. Debido a la naturaleza de la técnica, este tipo de test está ampliamente desarrollado para los análisis cromatográficos.
- Los controles de calidad o QCs se realizan con materiales de referencia y/o patrones de verificación. La inclusión de QCs proporciona una garantía del buen funcionamiento del procedimiento durante todo el proceso analítico (incluyendo la preparación de muestra). La extensión de las actividades de control de calidad tendrá en cuenta los aspectos críticos del análisis a controlar (exactitud, precisión, blancos).

En resumen, la cualificación de equipos y la validación de los métodos analíticos aseguran la calidad de los resultados antes de llevar a cabo los análisis. En cambio los test de idoneidad (SST) y los controles de calidad (QCs) aseguran la calidad de los resultados analíticos inmediatamente antes o durante el análisis de las muestras [Bansal et. al. 2004].

Es importante destacar la diferencia entre validación de métodos y cualificación de equipos. En ocasiones se ha llegado a considerar que al validar un método, el equipo ya está debidamente cualificado. Pero esto es un error ya que la cualificación evalúa el rendimiento de los módulos y/o el sistema completo en el rango operativo del equipo mientras que la validación se hace referente a los métodos de análisis [Burguess et al., 1998].

Tal y como se desarrollará a continuación, en la presente tesis se trabaja en relación a los dos primeros niveles de la pirámide:

- Actividades de cualificación de equipos.
- Validación de procedimientos de análisis y su aplicación en el cálculo de la incertidumbre asociada a las medidas.

1.3. CUALIFICACIÓN DE EQUIPOS: DQ, IQ, OQ y PQ

La gestión de equipos en un laboratorio supone la realización de un conjunto de actividades con la finalidad de garantizar su adecuación para la realización de las medidas. Las normas de correcta fabricación (GMP) incluyen el concepto de cualificación de equipos con el que se pretende demostrar de forma documentada que el equipo funciona correctamente para el uso previsto y que está debidamente calibrado [Eudralex, 2014].

1.3.1 Las 4 fases de cualificación

La USP <1058> emplea un modelo de 4 fases (4Qs) para la cualificación durante el ciclo de vida de un equipo [USP 34-NF 29 (b), 2011].

- La Cualificación de Diseño (*Design Qualification*, **DQ**) define las especificaciones funcionales y operacionales del instrumento, teniendo en cuenta los requerimientos de los usuarios. DQ es generalmente responsabilidad del vendedor.
- La Cualificación de Instalación (*Install Qualification*, **IQ**) establece que el instrumento ha sido entregado según diseño y especificaciones, que se instala adecuadamente en el entorno seleccionado, y que éste es adecuado para usar el instrumento.
- La Cualificación Operacional (*Operational Qualification*, **OQ**) demuestra que el instrumento funciona de acuerdo con las especificaciones operacionales, en el entorno escogido. El usuario debe seleccionar los parámetros que conforman el test OQ de acuerdo con el uso previsto. Por otra parte, la información del fabricante permitirá establecer las especificaciones de dichos parámetros. El test OQ, que habitualmente se realiza de forma modular, debe llevarse a cabo después de la IQ. Además, la OQ debe realizarse después de alguna acción que pueda afectar al equipo, como la recolocación de los equipos o el mantenimiento de éstos.

- La Cualificación de Ejecución de Proceso (*Performace Qualification, PQ*) demuestra que el instrumento funciona de acuerdo con las especificaciones establecidas por el usuario. La PQ inicial se realiza tras la OQ y se repetirá periódicamente, una vez el equipo ha entrado en su uso rutinario. El test PQ habitualmente se realiza de forma holística. Por lo tanto, se puede considerar que tiene dos objetivos, el análisis global para demostrar que el instrumento completo funciona correctamente y que es adecuado para su uso rutinario.

La Figura 1.5 resume de forma esquemática la relación entre las diferentes actividades de cualificación que deben aplicarse a los equipos de un laboratorio de análisis químico:

- Antes de la adquisición del equipo se lleva a cabo la DQ.
- Antes del uso en rutina del equipo, se llevan a cabo la IQ correspondiente a la instalación y la OQ y la PQ iniciales.
- Durante el uso en rutina del equipo, se realizará la PQ de forma periódica y se repetirá la OQ, especialmente de forma vinculada a algún cambio (ej.: reparación).

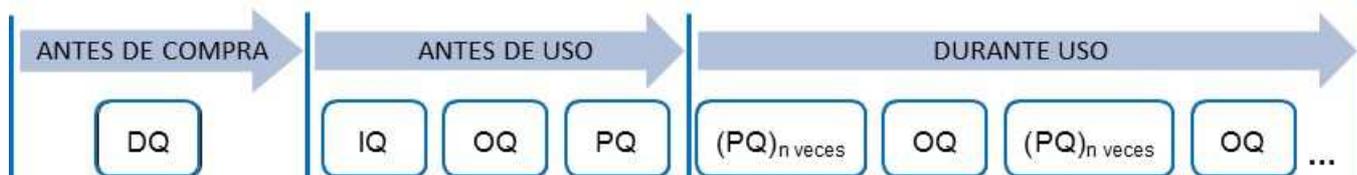


Figura 1.5. Esquema de cualificación durante el ciclo de vida de un equipo.

1.3.2 Actividades para la cualificación

El laboratorio debe incluir en sus procedimientos las actividades de cualificación a llevar a cabo y las especificaciones requeridas. A continuación se detallan algunas de las consideraciones a tener en cuenta en cada una de ellas [Huber, 2007].

Para la cualificación de diseño (DQ):

- Definir el uso del equipo y los requerimientos del usuario.
- Asegurar que los fabricantes y proveedores seleccionados son capaces de dar el soporte necesario según las necesidades del laboratorio y durante todo el ciclo de vida del equipo.

Para la cualificación de instalación (IQ):

- Disponer de la descripción del equipo, incluyendo en base de datos toda la información relacionada.
- Verificar que los suministros de servicios del laboratorio (agua, luz, gas, etc.) y el entorno de trabajo donde se ubicará el equipo cumplen las especificaciones del fabricante.
- Tener en cuenta los requerimientos de la infraestructura informática, por ejemplo en relación a la red y al sistema de almacenamiento de datos.
- Comprobar que la entrega se realiza de acuerdo con la orden de compra.
- Llevar a cabo de forma correcta el montaje e instalación del equipo, garantizando la correcta instalación del software. Si es necesario, se debe requerir la colaboración del proveedor durante la fase IQ.
- Realizar las pruebas de diagnóstico y verificación recomendadas por el fabricante. Si el proveedor realiza la IQ, debe quedar constancia de su participación mediante firmas o certificados.

Para la cualificación operacional (OQ):

- Verificar los parámetros fijos (no cambian durante la vida del equipo), que no se hayan llevado a cabo durante la IQ. Por ejemplo, el almacenamiento seguro de datos, las copias de seguridad (*backup*) y archivo. La verificación de estos parámetros fijos incluidos en la OQ inicial no será necesario repetirla si no se producen modificaciones en los mismos.
- Realizar las pruebas establecidas para verificar las funciones y parámetros críticos.

- Si el vendedor puede realizar la OQ, al menos la primera vez, puede ser recomendable aprovechar la garantía y experiencia del proveedor.
- Si el equipo se va a utilizar para varias aplicaciones, es recomendable utilizar para el test unos patrones genéricos.
- Si hay equipos similares en el laboratorio, debe utilizarse el mismo procedimiento y criterios de aceptación para todos.

Para la cualificación de funcionamiento (PQ):

- Realizar las pruebas establecidas (*performance checks*).
- Desarrollar procedimientos de uso, calibración, mantenimiento y control de cambios del equipo.
- Elaborar el libro de registro del equipo (*logbook*).
- Establecer los procedimientos de actuación en caso de que no se cumplan los criterios de aceptación establecidos o que el equipo quede fuera de uso.

Finalmente, cabe destacar que no se debe tomar la cualificación de equipos únicamente como la aplicación de un test que permite conocer si el equipo es apto o no para el uso, sino también como una prueba que muestra tendencias de los resultados, permite conocer *troubleshootings* y facilita al usuario familiarizarse y conocer los equipos con los que trabaja [Crowther et al., 2008].

En cualquier caso, es importante destacar que la responsabilidad última del estado de cualificación de un equipo es del usuario, aunque delegue la realización de alguna de las actividades. Tal y como se ha indicado, el usuario debe especificar sus requerimientos durante la DQ, revisar y aprobar la documentación IQ y asegurar que la OQ es acorde con los requerimientos DQ y llevar a cabo un PQ según sus necesidades de análisis. La Unidad de Garantía de Calidad debe comprender y revisar el cumplimiento de las actividades de cualificación establecidas. La adecuación científico-técnica de las mismas es responsabilidad del usuario.

1.3.3 Categorías de equipos para su cualificación

La USP <1058> establece tres categorías de equipos, de menor a mayor complejidad, según la extensión de las actividades de cualificación que sean necesarias para demostrar “la adecuación al uso previsto”: Grupo A, Grupo B y Grupo C [USP 34-NF 29 (b), 2011].

Grupo A: Este grupo está formado por equipos que no facilitan un valor de medida y que no requieren de calibración. Las especificaciones del fabricante de la funcionalidad básica del equipo se aceptan como requerimientos de usuario [Ermer y Nethercote, 2014].

La Tabla 1.2 incluye ejemplos de equipos del grupo A.

Equipos del Grupo A
Evaporadores de nitrógeno
Agitadores magnéticos
Mezcladores vortex
Centrífugas

Tabla 1.2. Equipos del Grupo A.

La conformidad de los equipos del Grupo A con los requerimientos de usuario se verifica mediante la observación visual de su funcionamiento.

Grupo B: Este grupo está formado por equipos o instrumentos sencillos (de fácil instalación) que proporcionan valores de medida o controlan parámetros físicos (como temperatura, presión o flujo) que requieren calibración. Los requerimientos de los usuarios coinciden habitualmente con las especificaciones del fabricante de funcionalidad y límites de operación.

La Tabla 1.3 incluye ejemplos de equipos del grupo B.

Equipos del Grupo B	
Balanzas	Muflas
Determinadores de punto de fusión	Estufas
pHmetros	Neveras
Pipetas	Congeladores
Refractómetros	Baños de agua
Termómetros	Bombas de vacío
Valoradores	Viscosímetros

Tabla 1.3. Equipos del Grupo B.

La conformidad de los equipos del Grupo B con los requerimientos de usuario se determina de acuerdo con procedimientos normalizados de trabajo desarrollados durante las actividades de cualificación del equipo [Ermer y Nethercote, 2014].

Grupo C: Este grupo está formado por instrumentos de medida y sistemas analíticos computarizados con softwares complejos. En este grupo, los requerimientos sobre funcionalidades y límites OQ y PQ se establecen de forma específica según la aplicación analítica prevista [Ermer y Nethercote, 2014].

La Tabla 1.4 incluye ejemplos de equipos del grupo C.

Equipos del Grupo C	
Espectrofotómetros de absorción atómica (AAS)	Difractómetros de rayos X
Calorímetros DSC	Analizadores elementales
Microscopios electrónicos	Cromatógrafos de gases
Cromatógrafos HPLC	Espectrómetros de IR
Espectrómetros de masas	Espectrofotómetros UV-VIS
Analizadores termogravimétricos	Espectrómetro de emisión ICP
Espectrómetros de fluorescencia de rayos X	

Tabla 1.4. Equipos del Grupo C.

La conformidad de los equipos del Grupo C con los requerimientos de usuario se determina mediante un proceso de cualificación complejo y específico.

1.3.4 Cualificación OQ y PQ en HPLC

En HPLC, el objetivo principal de la OQ es verificar que los parámetros principales (flujo, composición de la mezcla de la fase móvil, temperatura del horno de la columna, longitud de onda del detector, etc.) cumplen con los límites especificados de precisión y exactitud. Por ejemplo, si el usuario ha seleccionado un flujo de 1 mL/min, éste debe cumplir con una tolerancia concreta (p. ej. 0,95-1,05 mL/min) y no ser considerablemente diferentes (0,7 o 1,3 mL/min) [Bedson y Rudd, 1999].

Las pruebas de una OQ pueden ser modulares o integrales. Las pruebas modulares de los componentes de un sistema cromatográfico pueden facilitar la detección de un componente estropeado y debe hacerse siempre que sea posible. Los test integrales, implican a todo el sistema y pueden sustituir a las pruebas modulares. El alcance de las pruebas OQ puede ser más o menos exhaustivo y más o menos frecuente en función de las aplicaciones para las que se use el equipo. Por lo tanto, cada usuario tiene la posibilidad de diseñar su propio sistema de OQ [Krull y Swartz, 2002].

Cabe destacar la afirmación que Grisanti realiza acerca de la OQ: La cualificación operacional verifica que el cromatógrafo funciona de acuerdo a las especificaciones pero eliminando la contribución del método [Grisanti y Zachowski, 2002].

Por otra parte, el test PQ proporciona la confianza de que el HPLC, como un único instrumento funciona de acuerdo a las especificaciones y puede usarse para los análisis cromatográficos rutinarios [Bedson y Rudd, 1999]. Según Hall el test PQ debe diseñarse de la forma más simple y no invasiva posible y que proporcione una medición realista de la calidad del desempeño del sistema de HPLC [Hall y Dolan, 2002].

Grisanti declara también que para llevar a cabo el test PQ en un cromatógrafo es clave escoger un método con una mezcla de analitos, columna y disolventes adecuados. Este tipo de test conservará en buena medida la esencia de un test de idoneidad (SST), que confirma el buen funcionamiento del análisis durante su rutina de trabajo [Grisanti y Zachowski, 2002].

La relación entre el test PQ y los test de idoneidad (SST) ha sido objeto de debate de muchos autores.

Los test de idoneidad son una parte integral de los métodos de cromatografía y sirven para verificar la resolución y reproducibilidad del sistema cromatográfico. Estas pruebas se basan en el concepto de que el equipo, los componentes electrónicos, las operaciones analíticas y las muestras que deben analizarse constituyen un sistema integral que puede evaluarse como tal [USP 34-NF 29 (a), 2011]. El SST incluye el cálculo de parámetros como precisión de las áreas y los tiempos de retención, la anchura del pico a media banda y el ruido de la línea de base.

Algunos autores sostienen que la PQ debe llevarse a cabo en condiciones de trabajo similares a las de análisis rutinarios incluso defienden que con la información obtenida durante la realización del test de idoneidad (SST) se puede llegar a sustituir parte del test PQ o, en algunas ocasiones, remplazarlo por completo. En particular, Huber especifica que para el test PQ se debería utilizar la misma columna, las mismas condiciones de análisis y el mismo tipo de analitos que durante los análisis de rutina [Huber, 1998]. Del mismo modo, Kaminsky plantea un test PQ “ongoing”, que consiste en intercalarlo entre los análisis del laboratorio. Esto permitirá disponer de un gran volumen de resultados históricos y mediante cartas de control facilitar el seguimiento del equipo. Además, Kaminsky defiende que el SST puede proporcionar una información muy válida para el test PQ, llegando a veces a ser suficiente el uso de un SST como test PQ [Kaminski et al., 2010].

Otros autores mantienen que un test PQ tiene un objetivo muy diferente a un test de idoneidad. Bansal indica que el SST puede complementar al test PQ, pero no lo puede reemplazar. Además, una realización frecuente del test permitirá disponer de un historial del funcionamiento del equipo [Bansal et al., 2004].

La presente tesis utilizará el *know-how* del grupo de trabajo en relación a las actividades de confirmación metrológica, que tradicionalmente se vienen realizando, como punto de partida para desarrollar herramientas útiles en la cualificación de equipos. En particular, se pretende diseñar y aplicar para un cromatógrafo HPLC:

- Un test OQ mediante el cual se pueda asegurar desde un punto de vista modular el buen funcionamiento del cromatógrafo de acuerdo con las especificaciones del fabricante y del laboratorio.
- Un test PQ mediante el cual se pueda evaluar el correcto funcionamiento del equipo desde un punto de vista “caja negra”.

1.4.- VALIDACIÓN DE PROCEDIMIENTOS ANALÍTICOS Y DETERMINACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE

1.4.1 Documentación de la validación

Validar un procedimiento de análisis es demostrar de forma documentada que el procedimiento analítico conducirá con un alto grado de seguridad a la obtención de resultados adecuados conforme a los requisitos previamente establecidos [AEFI, 2001].

La validación de métodos analíticos se realiza para:

- Demostrar que los métodos son adecuados a los análisis propuestos en las condiciones descritas.
- Trabajar con métodos que ofrezcan confianza y seguridad en los resultados, lo cual minimiza el número de fallos y repeticiones.
- Aumentar el conocimiento del método analítico.
- Cumplir con las exigencias legales. Las Normas de Correcta Fabricación de medicamentos de la UE en el capítulo 6 de control de calidad indican que los métodos de análisis deben estar validados y, por otra parte, dentro de los requisitos técnicos de la ISO 17025:2005 se incluye “Métodos de ensayo y de calibración y validación de métodos”.
- Incluir la validación como requisito previo a la transferencia de métodos analíticos.

Toda validación comienza a partir de un método ya probado y ajustado. La validación trata de demostrar con un número mínimo de ensayos, que tanto el método de análisis como su sistema analítico asociado producirán resultados adecuados a las exigencias preestablecidas. Dicha información debe ser siempre documentada de acuerdo al siguiente esquema [AEFI, 2001]:

- Protocolo de validación: documento que ha de recoger el objetivo, la definición del sistema a validar, la identificación de los parámetros, el diseño del plan experimental y los criterios de aceptación. Debe ser específico para cada producto y método, debiendo ir firmado y fechado por las personas responsables de la validación y aprobación.

- Realización de la validación y evaluación de los resultados: Todos los datos primarios deben ser perfectamente auditables. Una vez realizada la parte experimental de la validación, se evaluarán los resultados obtenidos. Si durante la ejecución del protocolo se produce alguna modificación debe quedar constancia de ello.

- Informe de validación: Un informe de la validación donde se debe incluir la referencia al protocolo, los resultados de las determinaciones de cada parámetro, referencias de la cualificación de los equipos utilizados y los resultados y conclusiones de la validación.

- Certificado de validación: El certificado de validación o documento formal que emite el laboratorio, debe ser firmado por los responsables de la validación. Este certificado puede ser independiente del informe de la validación, incluyendo un resumen del protocolo de validación y de los resultados obtenidos, o bien anexarse al final de dicho informe.

- Archivo: Los documentos referentes a la validación se archivarán adecuadamente durante periodos de tiempo establecidos por el laboratorio, considerando los requisitos del sector afectado. Por ejemplo, para el análisis según GMP, se archivará durante todo el tiempo de vida del producto.

La Figura 1.6 resume las fases descritas anteriormente para llevar a cabo y documentar una validación:

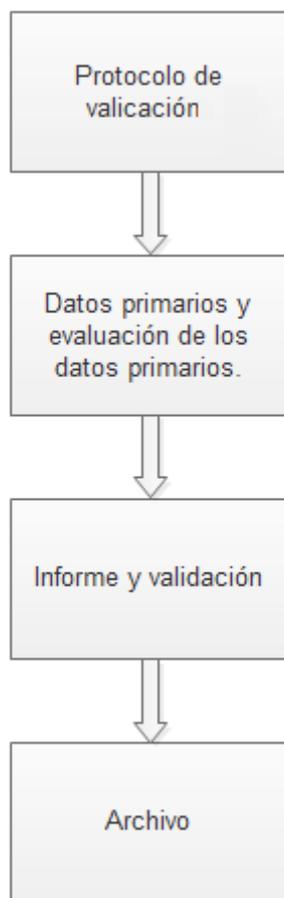


Figura 1.6. Esquema de validación [AEFI, 2001].

1.4.2 Parámetros de validación

En general, se consideran los siguientes parámetros: selectividad, linealidad, exactitud, precisión y límite de cuantificación/límite de detección [AEFI, 2001; ICH, 2005]:

a) Selectividad

Un método es selectivo si es capaz de distinguir y diferenciar la respuesta del analito de estudio, independientemente, de las otras sustancias que forman parte de la matriz, sin interferencias de impurezas, productos de degradación, compuestos relacionados y/o excipientes presentes en la muestra [AEFI, 2001].

La determinación de la selectividad depende de la técnica analítica aplicada y del tipo de ensayo. En los estudios de selectividad se utilizan ensayos de comparación, donde se tiene en cuenta las respuestas del patrón, el placebo, la muestra o el placebo adicionado, además del blanco de laboratorio.

En caso de que se observen interferencias, su nivel puede evaluarse a partir del cálculo del grado de discrepancia entre las determinaciones en presencia o ausencia de las posibles interferencias, mediante la Ecuación 1.1:

$$\text{Discrepancia (\%)} = \frac{D_i - D_s}{D_s} 100 \quad (\text{Ecuación 1.1})$$

Donde:

D_i = respuesta media con interferencia (habitualmente con 6 replicados del placebo adicionado)

D_s =respuesta media sin interferencia (habitualmente con 6 replicados del patrón)

b) Linealidad

La linealidad de un proceso analítico, es la capacidad de obtener una respuesta directamente proporcional a la concentración del analito, en un determinado intervalo de concentraciones. Los ensayos se pueden efectuar tanto sobre disoluciones patrón como sobre muestras adicionadas [AEFI, 2001].

Según el tipo de ensayo y de muestra se debe definir: el intervalo de concentraciones de trabajo, el número de patrones en el margen de estudio y el número de repeticiones por concentración de patrón (Tabla 1.5).

Tipo de ensayo	Intervalo concentraciones	Nº de patrones	Replicados de medida
Riqueza	95-105 %	3-5	3
Mayoritario	80-120 %	3-5	3
Minoritario ¹	50-120 %	5-7	3
Margen amplio	50-150 %	3-7	3

¹Para ensayo límite suele utilizarse el límite de cuantificación como concentración inferior.

Tabla 1.5. Modelos para el estudio de linealidad [Báguena, 2008]

Con los resultados del estudio de linealidad se prepara una tabla relacionando las cantidades o concentraciones x (variable independiente o predictiva) y la respuesta y (variable dependiente, por ejemplo áreas, alturas, absorbancias, etc.). La relación entre ambas variables se expresa matemáticamente como una recta de regresión del tipo $y = b x + a$, obtenida por un método de ajuste (por lo general el de mínimos cuadrados). La representación gráfica de la recta de regresión en un sistema de coordenadas junto con los valores experimentales, permite visualizar la bondad del ajuste.

El estudio de linealidad no sólo implica una representación gráfica sino que es necesario realizar una comprobación estadística. Algunas de las pruebas que se pueden realizar son las siguientes:

- Calcular el valor de las residuales, el coeficiente de determinación (R^2), la varianza residual, la varianza de la pendiente y la varianza del término independiente.
- Calcular el coeficiente de variación de los factores de respuesta (relación entre la lectura y la concentración). En una calibración lineal los factores de respuesta deben ser semejantes entre sí y sus inversos, cercanos al valor de la pendiente. En el entorno farmacéutico, habitualmente se recomienda que el coeficiente de variación de los factores de respuesta no supere el 2%.

c) Exactitud

La exactitud expresa la proximidad del valor obtenido frente a un valor considerado verdadero y aporta información de los errores sistemáticos del procedimiento. Una de las principales dificultades que se presentan al hacer un estudio de exactitud, es determinar el valor verdadero o de referencia. Para ello, puede utilizarse el valor obtenido a partir de un método ya validado, el valor de un material de referencia certificado o el resultado que se obtiene al aplicar el método de adiciones estándar [Barwick, 1999].

La exactitud se determina en todo el intervalo especificado para el método analítico. Se recomienda un mínimo de 9 determinaciones sobre tres niveles de concentración y habitualmente se expresa como porcentaje de recuperación.

La *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) presenta los valores orientativos aceptables para la recuperación en función de la concentración del analito (Tabla 1.6).

%Analito	Concentración	Recuperación%
100	100%	98 -102
10	10%	98-102
1	1%	97-103
0,1	0,1%	95-105
0,01	100 ppm	90-107
0,001	10 ppm	80-110
0,0001	1 ppm	80-110
0,00001	100 ppb	80-110
0,000001	10 ppb	60-115
0,0000001	1 ppb	40-120

Tabla 1.6. Valores orientativos para la recuperación según la AOAC.

La desviación de la exactitud por exceso se produce cuando existen interferencias y la selectividad del método no es la adecuada, entonces, se obtienen resultados superiores al valor verdadero. Las desviaciones por defecto suelen producirse cuando la matriz de muestra es compleja y la extracción del analito requiere varios pasos, obteniéndose resultados inferiores al valor verdadero.

d) Precisión

La precisión de un proceso analítico representa el grado de dispersión de una serie de resultados, obtenidos a partir de múltiples repeticiones de una misma muestra homogénea en las condiciones descritas en el método. Estudia la variabilidad que existe entre los diferentes resultados, pero sin tener en cuenta su proximidad al valor real [AEFI, 2001].

El objetivo del estudio de la precisión es conocer la variabilidad debida a errores aleatorios inherentes a todo método de ensayo. Según el mayor o menor grado de concordancia entre las distintas fuentes que introducen variabilidad al resultado, se puede distinguir entre [ICH, 2005].

- **Repetibilidad:** Es la medida de precisión entre resultados particulares, adquiridos en las mismas condiciones, por un mismo analista, en el mismo laboratorio, con los mismos equipos y reactivos, y en el curso de la misma serie de análisis efectuados, generalmente, en un intervalo corto de tiempo.
- **Precisión intermedia:** Es la precisión entre resultados particulares de una misma muestra, incluyendo variaciones dentro del mismo laboratorio, es decir, diferentes días, condiciones de operación, analista o equipos.
- **Reproducibilidad:** Estudia la variabilidad del método bajo condiciones operativas diferentes y en distintos laboratorios.

El estudio de precisión se suele realizar a tres niveles de concentración y se expresa como el coeficiente de variación (CV%) de la serie de medidas.

La *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) propone una serie de valores límite de coeficiente de variación del método en función de la concentración del analito (Tabla 1.7).

%Analito	Concentración	CV% AOAC
100	100%	1,3
10	10%	2,8
1	1%	2,7
0,1	0,1%	3,7
0,01	100 ppm	5,3
0,001	10 ppm	7,3
0,0001	1 ppm	11
0,00001	100 ppb	15
0,000001	10 ppb	21
0,0000001	1 ppb	30

Tabla 1.7. Valores orientativos para el coeficiente de variación según la AOAC.

e) Límite de cuantificación y límite de detección

El límite de cuantificación (LC) se define como la mínima cantidad de analito presente en la muestra que se puede cuantificar, bajo las condiciones experimentales descritas, con una adecuada precisión y exactitud [ICH, 2005].

El límite de detección (LD) es la mínima cantidad de analito en la muestra que se puede detectar, aunque no necesariamente cuantificar. Es un parámetro cualitativo [ICH, 2005].

En procedimientos instrumentales es posible calcularlos de forma teórica a partir de la variabilidad de la señal del blanco o en el caso de métodos cromatográficos a partir de la variabilidad de la señal de la línea de base (ruido). Se establece como LC la concentración cuya señal corresponde a 10 veces dicha variabilidad y como LD la concentración cuya señal corresponde a 3 veces dicha variabilidad [ICH, 2005].

Por otra parte, se puede determinar el LC de forma experimental mediante el análisis de muestras con concentraciones decrecientes de analito, estableciendo el LC como el nivel mínimo en el que se obtienen valores de recuperación y precisión aceptables [AEFI, 2001]. En particular EURACHEM

propone como criterio que el coeficiente de variación para la precisión sea inferior al 20%.

En el rango de concentraciones comprendidas entre LD y LC no puede cuantificarse el analito con razonable certeza. No obstante, puede detectarse su presencia sin incurrir en falsos positivos.

1.4.3 Esquema de validación

Al diseñar el protocolo de validación el responsable de la misma debe definir los parámetros que se deben estudiar y los criterios de aceptación correspondientes, teniendo en cuenta requisitos técnicos propios del tipo de análisis y otros requisitos relacionados. El hecho de que sea necesario evaluar unos u otros parámetros dependerá básicamente del tipo de ensayo. La Tabla 1.8 que se presenta a continuación resume las recomendaciones de los parámetros a realizar según los métodos analíticos sean de identificación, determinación de impurezas cuantitativo, impurezas test límite (cualitativo o como mucho semicualitativo) y valoración [ICH, 2005]:

Parámetro	Identificación	Impurezas cuantitativo	Impurezas test límite	Valoración
Exactitud	No	Si	No	Si
Precisión	No	Si	No	Si
Selectividad	Si	Si	Si	Si
Límite de detección	No	No	Si	No
Límite de cuantificación	No	Si	No	No
Linealidad	No	Si	No	Si

Tabla 1.8. Esquema de validación según tipología de métodos analíticos ICH Q2A.

1.4.4 Revalidación

Los estudios de validación son utilizados para demostrar la fiabilidad de los resultados analíticos obtenidos. En algunos casos, no hace falta realizar un estudio completo de validación, sino que es suficiente con hacer una revalidación. Es decir, verificar mediante pruebas documentadas que un método analítico previamente validado, continúa siendo suficientemente fiable

tras realizar cambios respecto al método inicial. Los parámetros a estudiar en una revalidación dependen de la naturaleza de los cambios realizados y de la importancia que puedan tener sobre los resultados del análisis [Loftus y Nash, 1984].

La Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (AEFI) proporciona unas directrices que el responsable del estudio puede tener en cuenta para definir el protocolo de revalidación (Tabla 1.9).

Cambio de:	Selectividad	Linealidad	Exactitud	Precisión	LC
Tipo de muestra o matriz	Si	Si	Si	No	Si ¹
Instrumentos	Si	Si	No	Si	Si ¹
Condiciones operacionales	Si	No	No	Si	Si ¹
Proceso de síntesis del analito	Si	Si	Si	No	Si ¹

¹ El Límite de Cuantificación (LC) sólo se calcula si procede.

Tabla 1.9. Parámetros a revalidar según los cambios [AEFI, 2001].

En general las etapas a tener en cuenta en una revalidación son las siguientes:

- Identificar los cambios respecto al método inicial. Por ejemplo, cambio de muestra, instrumentos o condiciones operacionales.
- Establecer la importancia de los cambios sobre el análisis.
- Definir el protocolo, es decir, las pruebas necesarias a realizar, los criterios de aceptación y los responsables de realizar la revalidación.
- Realizar las actividades establecidas en el protocolo.
- Revisar los resultados y compararlos con los criterios de aceptación previamente establecidos.
- Actualizar el procedimiento de análisis (PNT) para incluir las nuevas condiciones de análisis y los resultados de la revalidación.
- Elaborar el informe final, que debe contener la declaración del cumplimiento de los requisitos y permitirá concluir acerca de la revalidación realizada.

1.4.5 Determinación de la incertidumbre: Método *bottom-up* (EURACHEM) y Método *top-down* (Analytical Methods Committee)

Según la GUM (*Guide to the expression of uncertainty in measurement*), la incertidumbre es el parámetro asociado al resultado de una medida que caracteriza la dispersión de los valores que podrían ser razonablemente atribuidos al mesurando [GUM, 2008]. La incertidumbre se asocia con el intervalo dentro del cual se encuentra el valor verdadero de la medida, una vez efectuadas las correcciones debidas a errores conocidos.

La incertidumbre incluye diversos componentes relacionados con las fuentes de error que determinan la precisión y la exactitud de la medida. Por ello, el valor estimado de la incertidumbre (u) engloba el conjunto de errores sistemáticos (exactitud) y aleatorios (precisión). El valor obtenido de incertidumbre se multiplica por un factor de cobertura para obtener la incertidumbre expandida o tolerancia. Habitualmente, se utiliza un factor de 2 para tener un nivel de confianza del 95% [Meyer, 2007].

El resultado de un ensayo (X_{exp}) o el valor medio de los replicados realizados (X_{media}) puede no coincidir con el **valor verdadero**. Además, debido a la imposibilidad conceptual de conocer dicho valor verdadero, se considera que el **valor de referencia** es su mejor aproximación. De esta manera, el intervalo $X_{media} \pm 2u$ incluirá el valor verdadero, con una seguridad del 95 % (Figura 1.7).

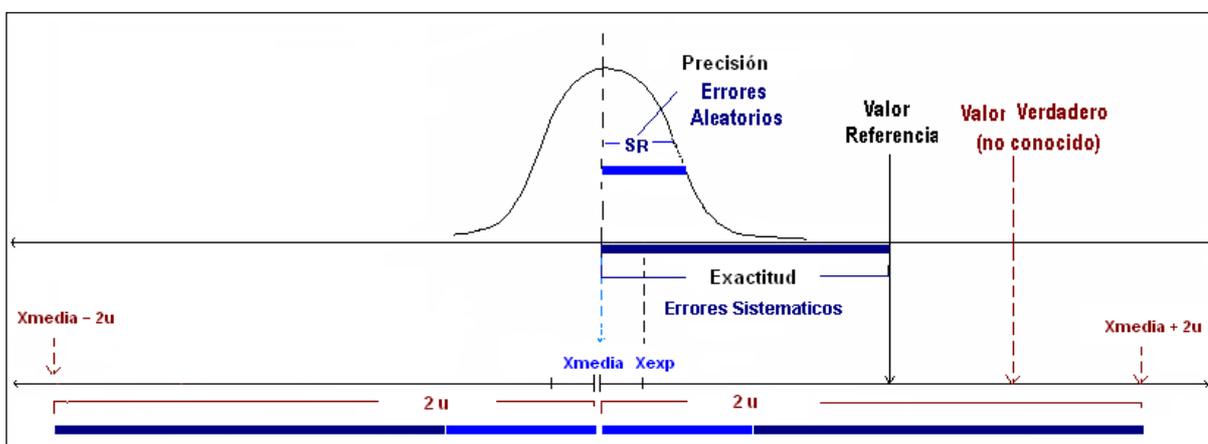


Figura 1.7. Incertidumbre de las medidas [Báguena et al., 2008].

A la hora de evaluar la adecuación de un resultado analítico, se deben considerar el valor experimental obtenido, la incertidumbre del resultado y las especificaciones que debe cumplir el producto analizado (indicadas como límite superior e inferior). Las diferentes situaciones en que nos podemos encontrar se detallan a continuación y se presentan en la Figura 1.8.

- a) Situación aceptable: El resultado \pm incertidumbre siempre estará dentro de especificaciones.
- b) Situación cuestionable: El resultado cumple con especificaciones, pero el resultado \pm incertidumbre podría estar fuera de especificaciones.
- c) Situación cuestionable: El resultado no cumple especificaciones, pero resultado \pm incertidumbre podría estar dentro de especificaciones.
- d) Situación rechazable: El resultado \pm incertidumbre siempre estará fuera de especificaciones.

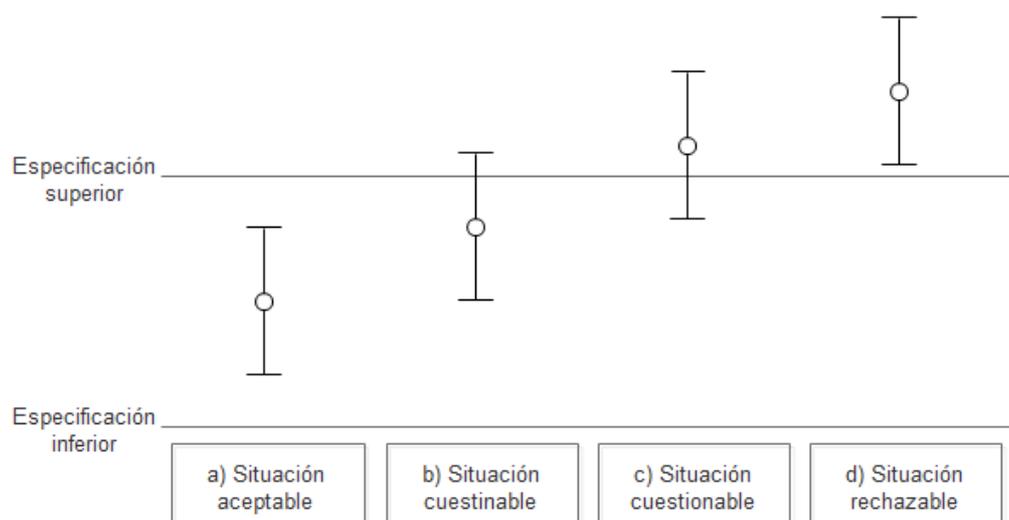


Figura 1.8. Incertidumbre y límites de un resultado [EURACHEM/CITAC, 2012].

Tal y como se ha comentado anteriormente, un requisito en virtud de ISO/IEC 17025 es que los laboratorios determinen y faciliten la incertidumbre asociada a los resultados analíticos [UNE-EN-ISO 17025:2005]. Para este fin, los laboratorios deberían disponer de suficientes datos derivados de la validación/verificación del método, de estudios entre laboratorios y actividades de control interno de la calidad, que puedan utilizarse para estimar la incertidumbre, para los métodos utilizados de forma rutinaria en el laboratorio [CAC/GL 59, 2006].

En la práctica la incertidumbre puede provenir de muchas fuentes posibles: el muestreo, condiciones ambientales de almacenamiento de la muestra, efectos de matriz e interferencias, efectos de los equipos, pureza de los reactivos, etc [EURACHEM/CITAC, 2012].

Al estimar la incertidumbre de un resultado, puede ser necesario tomar cada fuente de incertidumbre y tratarlas por separado para obtener la contribución de esa fuente. Estas contribuciones se denominan **componentes** de la incertidumbre. Un componente de incertidumbre, cuando se expresa como desviación estándar, se conoce como **incertidumbre estándar**. A menudo es posible evaluar el efecto combinado de varios componentes, reduciéndose así el esfuerzo general de cálculo.

La incertidumbre de un resultado de medida (y) se expresa como **incertidumbre estándar combinada** ($u_c(y)$). Se calcula utilizando la ley de propagación de incertidumbre, como la raíz cuadrada de las varianzas obtenidas por combinación de todos los componentes de incertidumbre.

Para la mayoría de propósitos en química analítica, la incertidumbre se expresa como **incertidumbre expandida** (U). La incertidumbre expandida proporciona un intervalo dentro del cual el valor del mesurando se considera que se encuentran con un cierto nivel de confianza. U se obtiene multiplicando $u_c(y)$, la incertidumbre estándar combinada, con un factor de cobertura factor k . La elección del factor k está basado en el nivel de confianza deseado. Tal y como

se ha comentado anteriormente, un factor de $k=2$ corresponde a una seguridad del 95 %.

Existen varias opciones posibles para la estimación de la incertidumbre en un laboratorio. Entre ellas, hay dos procedimientos que se denominan *bottom-up* y *top-down* que son los más comúnmente utilizados [Konieczka y Namiesnik, 2010].

I) Método *bottom-up* de EURACHEM

El método *bottom-up*, método desarrollado en la guía EURACHEM proporciona un enfoque basado en la descomposición de todas las operaciones analíticas en actividades primarias. Estas se combinan o agrupan en actividades comunes y se hace una estimación de su contribución al valor de la incertidumbre del proceso de medición. Este método puede ser muy laborioso y exige un conocimiento exacto de todo el proceso analítico. No obstante, existen algunas herramientas que pueden ayudar a determinar las diferentes fuentes de incertidumbre, como pueden ser el diagrama de flujo y el diagrama de Ishikawa (o diagrama de espina de pescado). Estas herramientas ayudan a entender el procedimiento analítico e identificar los distintos componentes de la incertidumbre [Meyer, 2007].

Según EURACHEM este procedimiento *bottom-up* para estimar la incertidumbre está basado en cuatro pasos [EURACHEM/CITAC, 2012]:

- Especificar qué se va a medir: Este primer paso consiste en especificar el mesurando. Se establece la relación que hay entre lo que se va a medir y los parámetros de los que esta medida depende. Por ejemplo, en una valoración de ácido con una base, los parámetros que afectan a ésta son la concentración de la base, el volumen gastado de ésta y el volumen de muestra.
- Identificar las fuentes o componentes que proporcionan la incertidumbre: Tras determinarse el mesurando, deben identificarse todas las fuentes de

incertidumbre. En esta etapa, no hay que centrarse en la cuantificación individual, sino que el objetivo es identificar todas las fuentes de incertidumbre posible. En el caso de la valoración ácido-base se tendrían en cuenta, por ejemplo, valores como el error de la bureta o el error imputable al analista.

- Cuantificar la incertidumbre de los componentes. En esta etapa se cuantificarán todas las fuentes de incertidumbre identificadas en la etapa anterior. El valor de incertidumbre de cada fuente se obtendrá:
 - a) Experimentalmente, es decir, mediante medidas hechas en el laboratorio.
 - b) Usando información disponible: certificados de análisis de los patrones, certificados de incertidumbre de balanzas o termómetros, o documentación de los equipos utilizados.

En el ejemplo planteado obtendríamos la incertidumbre de la bureta mediante documentación; y por otro lado, el error del analista vendría determinado mediante repeticiones experimentales.

- Calcular la incertidumbre combinada y la incertidumbre expandida. Este último paso consiste en determinar la incertidumbre de medida. Para ello, es necesario que todas las contribuciones anteriormente cuantificadas se expresen como incertidumbre estándar. Finalmente, se calcula la incertidumbre estándar combinada y la incertidumbre expandida, escogiendo el factor de cobertura adecuado.

Calcular la incertidumbre con la aproximación de EURACHEM tiene la ventaja de que, como se tienen que identificar y cuantificar todas las fuentes de incertidumbre del método analítico, se puede disminuir la incertidumbre de los resultados mejorando aquellas partes del método que contribuyan más a la incertidumbre final del resultado. Sin embargo, el elevado número de etapas y de fuentes de error de los métodos analíticos hace que sea muy tedioso calcular correctamente la incertidumbre siguiendo esta estrategia.

Estas etapas del método *bottom-up* se presentan de forma esquemática en la Figura 1.9.

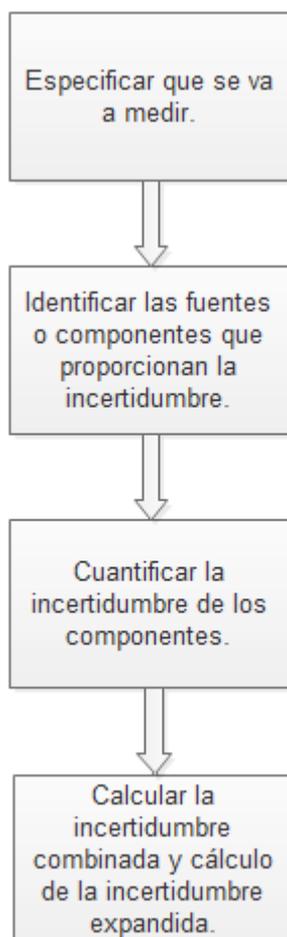


Figura 1.9. Proceso para la estimación de la incertidumbre según ISO [EURACHEM/CITAC, 2012].

II) Método *top-down* (*Analytical Methods Committee*)

El método *top-down*, método propuesto por el *Analytical Methods Committee* (AMC), se basa en la estimación de la incertidumbre a partir de la desviación estándar procedente de la reproducibilidad de los estudios colaborativos entre laboratorios. Este enfoque, basado en un sencillo modelo de cálculo, considera que la dispersión entre los resultados facilitados por los distintos laboratorios

incluye todas las fuentes de errores sistemáticos y aleatorios [Analytical Methods Committee, 1995].

La ventaja de la aproximación propuesta por el AMC, respecto a la de EURACHEM es que calcula la incertidumbre globalmente sin tener que identificar y cuantificar cada una de las fuentes de error del procedimiento analítico. El inconveniente de esta aproximación es que es difícilmente aplicable ya que muchas veces no se dispone de información sobre estudios colaborativos para el tipo de muestra y método analítico utilizado [Maroto et al., 2000].

1.4.6 Estimación de la incertidumbre a partir de los resultados de validación

La incertidumbre se puede calcular con los datos obtenidos durante la validación del procedimiento de análisis, tanto si se utilizan materiales de referencia como muestras adicionadas con patrón [Báguena et al., 2008]. Esta aproximación se considera un modelo intermedio entre los dos anteriores.

La ecuación propuesta para el cálculo de la incertidumbre es una suma cuadrática que incluye los términos siguientes: incertidumbre del patrón ($u_{\text{patrón}}$), incertidumbre del sistema instrumental ($u_{\text{sistema instrumental}}$) e incertidumbre de la muestra (u_{muestra}) (Ecuación 1.2).

$$u(\%) = \sqrt{u_{\text{patrón}}^2 (\%) + u_{\text{sistema instrumental}}^2 (\%) + u_{\text{muestra}}^2 (\%)} \quad (\text{Ecuación 1.2})$$

Cabe destacar que todos los términos incluidos en los cálculos relacionados con la Ecuación 1.2 deben de ser de tipo gaussiano. Por ello, los términos que correspondan a una función rectangular se normalizan convenientemente mediante la aplicación del factor de raíz de 3 ($\sqrt{3}$) [EURACHEM/CITAC, 2012].

Por otra parte, los términos obtenidos a partir de la información disponible sobre tolerancias ($\pm T$) deben dividirse por el factor de cobertura utilizado. Al expresar los diferentes sumandos en porcentaje (%), se garantiza la coherencia de las unidades.

A continuación se explica cómo se calcula cada uno de los tres términos que forman la Ecuación 1.2:

a) La incertidumbre del patrón se calcula a partir de la suma cuadrática de la incertidumbre certificada por el fabricante del patrón o del material de referencia (u_{stock}) y la incertidumbre correspondiente a su preparación por pesada o dilución ($u_{\text{preparación}}$) (Ecuación 1.3).

$$u_{\text{patrón}} (\%) = \sqrt{u_{\text{stock}}^2 (\%) + u_{\text{preparación}}^2 (\%)} \quad (\text{Ecuación 1.3})$$

La **incertidumbre stock** (u_{stock}) se calcula a partir de la tolerancia (T) o la pureza (P) proporcionadas por el fabricante del patrón o del material de referencia (Ecuación 1.4 y 1.5, respectivamente):

$$u_{\text{stock}} (\%) = \frac{T\%}{2} \quad (\text{Ecuación 1.4})$$

$$u_{\text{stock}} (\%) = \frac{(100 - P\%)}{\sqrt{3}} \quad (\text{Ecuación 1.5})$$

La **incertidumbre de preparación** ($u_{\text{preparación}}$) se calcula teniendo en cuenta cada una de los pasos realizados en la preparación del patrón (pesada, dilución, etc), siendo cada uno de ellos un término independiente de la suma cuadrática:

La incertidumbre asociada a la **pesada** se calcula a partir de la tolerancia ($\pm T$, en g) de la balanza (Ecuación 1.6):

$$u_{\text{pesada}}(\%) = \frac{T(\text{g})/2}{\text{pesada}(\text{g})} 100 \quad (\text{Ecuación 1.6})$$

La incertidumbre asociada a un proceso de **dilución** o enrase se calcula a partir de la tolerancia ($\pm T$, en mL) del material volumétrico utilizado (Ecuación 1.7):

$$u_{\text{dilución}}(\%) = \frac{T(\text{mL})/2}{\text{volumen}(\text{mL})} 100 \quad (\text{Ecuación 1.7})$$

El término de la incertidumbre de preparación ($u_{\text{preparación}}$) incluye los errores de manipulación del analista al preparar los patrones. Cuando esta preparación se realiza de forma independiente para cada nivel de concentración, el término $u_{\text{preparación}}$, quedará incluido en el término $u_{\text{precisión}}$ del sistema instrumental.

b) La incertidumbre del sistema instrumental incluye el conjunto de fuentes de error relacionadas con la resolución, el calibrado y la estabilidad de la medida. Se calcula como la suma cuadrática de la incertidumbre asociada a la resolución del equipo de medida ($u_{\text{resolución}}$), a la precisión ($u_{\text{precisión}}$) y a la exactitud ($u_{\text{exactitud}}$) del calibrado, teniendo en cuenta que la estabilidad de la medida queda incluida en el término de precisión (Ecuación 1.8).

$$u_{\text{sistema instrumental}}(\%) = \sqrt{u_{\text{resolución}}^2(\%) + u_{\text{precisión}}^2(\%) + u_{\text{exactitud}}^2(\%)} \quad (\text{Ecuación 1.8})$$

Habitualmente, se considera despreciable la aportación de la resolución ($u_{\text{resolución}} = \text{resol}/\sqrt{3}$). Con ello, el cálculo de la incertidumbre del sistema instrumental se simplifica (Ecuación 1.9):

$$u_{\text{sistema instrumental}}(\%) = \sqrt{u_{\text{precisión}}^2(\%) + u_{\text{exactitud}}^2(\%)} \quad (\text{Ecuación 1.9})$$

La **incertidumbre de la precisión** ($u_{\text{precisión}}$) se calcula a partir del coeficiente de variación de los n replicados de medida (Ecuación 1.10).

$$u_{\text{precisión}}(\%) = \frac{CV(\%)}{\sqrt{n}} \quad (\text{Ecuación 1.10})$$

La **incertidumbre de la exactitud** ($u_{\text{exactitud}}$) se calcula a partir de las ecuaciones 1.12 o 1.13, según se realice la cuantificación por interpolación en recta de calibrado o por factor de respuesta:

Si la cuantificación se realiza por recta de calibrado, la incertidumbre de la exactitud ($u_{\text{exactitud}}$) se calcula a partir del valor de la residual (Ecuación 1.11).

$$\text{residual}(\%) = \frac{|Y_{\text{exp}} - Y_{\text{cal}}|}{Y_{\text{cal}}} 100 \quad (\text{Ecuación 1.11})$$

Y_{exp}: medida experimental.

Y_{cal}: valor calculado interpolando el valor de la concentración del patrón en la recta de calibrado.

La incertidumbre de la exactitud ($u_{\text{exactitud}}$) se obtendrá como el valor promedio de la residual (%) de todos los patrones de la recta o como el peor valor de residual (%) entre $\sqrt{3}$ (Ecuación 1.12).

$$u_{\text{exactitud}}(\%) = \text{Promedio (residual (\%))} \text{ o } \frac{\text{Máx(residual (\%))}}{\sqrt{3}} \quad (\text{Ecuación 1.12})$$

Si la cuantificación se realiza por factor de respuesta, para obtener la incertidumbre de la exactitud ($u_{\text{exactitud}}$) se utiliza un factor de respuesta de referencia (Ecuación 1.13).

$$u_{\text{exactitud}} (\%) = \frac{|F_{R \text{ exp}} - F_{R \text{ ref}}|}{F_{R \text{ ref}}} 100 \quad (\text{Ecuación 1.13})$$

$F_{R \text{ exp}}$: Factor de respuesta del patrón más próximo a la medida experimental.

$F_{R \text{ ref}}$: Factor de respuesta de referencia.

El factor de respuesta de referencia se obtiene como el valor promedio de los factores de respuesta de todos los patrones preparados.

c) La incertidumbre asociada a la muestra se obtiene tras realizar una serie de análisis replicados del material de referencia o de la muestra y sus correspondientes adiciones. Se calcula como la suma cuadrática de los términos correspondientes a la preparación, la precisión y la exactitud de los resultados obtenidos (Ecuación 1.14).

$$u_{\text{muestra}} (\%) = \sqrt{u_{\text{preparación}}^2 (\%) + u_{\text{precisión}}^2 (\%) + u_{\text{exactitud}}^2 (\%)} \quad (\text{Ecuación 1.14})$$

La influencia de la **preparación** ($u_{\text{preparación}}$) de la muestra queda incluida en el término de la precisión si se realiza de forma independiente para cada ensayo.

La **incertidumbre de precisión** ($u_{\text{precisión}}$), corresponde al coeficiente de variación de los n replicados de medida realizados en condiciones de repetibilidad o precisión intermedia (Ecuación 1.15).

$$u_{\text{precisión}} (\%) = \frac{CV (\%)}{\sqrt{n}} \quad (\text{Ecuación 1.15})$$

La **incertidumbre de exactitud** ($u_{\text{exactitud}}$), se calcula a partir del valor del sesgo obtenido en la recuperación del material de referencia utilizado o de las muestras adicionadas con patrones. Este valor también se puede obtener teniendo en cuenta el promedio de los sesgos o el peor valor dividido por la raíz cuadrada de tres (Ecuación 1.16).

$$u_{\text{exactitud}} (\%) = \text{Promedio}(\text{S sesgo}(\%)) \text{ o } \frac{\text{Máx}(\text{S sesgo}(\%))}{\sqrt{3}} \quad (\text{Ecuación 1.16})$$

Tal y como se ha comentado anteriormente (Tablas 1.1.a y 1.1b), en trabajos previos del grupo de investigación vinculados con la implementación de la ISO 17025 [Báguena, 2008; Gotor, 2008], se iniciaron los estudios sobre validación de métodos y su aplicación al cálculo de incertidumbre. Además, en el Trabajo de Final de Carrera de Gemma Gotor Navarra se hizo énfasis en el diseño del protocolo de validación de métodos analíticos.

En la presente tesis doctoral se pretende optimizar y revalidar el procedimiento de análisis de nitrógeno Kjeldahl en muestras de taurina. Las condiciones de trabajo se han modificado, teniendo en cuenta los resultados disponibles de la confirmación metrológica del equipo.

Además, se pretende desarrollar la metodología para el cálculo de la incertidumbre aprovechando los resultados que se obtienen durante la validación de los procedimientos de análisis. Esta metodología se aplicará en:

- La determinación de cloruros en lixiviados por HPLC, con columna de intercambio iónico y detector de conductividad sin columna supresora.
- La determinación de la distribución de ácidos grasos en muestras de estearato de magnesio por GC con columna capilar y detector de ionización de llama.

2. OBJETIVOS

Teniendo en cuenta los antecedentes previamente descritos, **los objetivos de la presente Tesis Doctoral son los siguientes:**

1. Diseñar actividades de cualificación de cromatógrafos de líquidos que permitan garantizar que el equipo funciona adecuadamente para su uso previsto. Los test de cualificación diseñados según requisitos GMP, deberán facilitar las actividades de calibración y verificación definidas en las normas ISO 9001 y 17025.
2. Aplicar el valor de la incertidumbre de las medidas en la optimización de procedimientos de análisis de productos farmacéuticos.
3. Desarrollar modelos de cálculo de la incertidumbre a partir de los resultados obtenidos durante la validación de los procedimientos de análisis cromatográfico, identificando la contribución de cada una de las fuentes de error asociadas a las diferentes etapas del procedimiento.

3. CUALIFICACIÓN DE EQUIPOS EN HPLC

3.1. INTRODUCCIÓN

En la presente tesis se ha planteado como objetivo el diseño de los test OQ y PQ para un cromatógrafo de líquidos (HPLC), equipo del grupo C según la clasificación USP <1058>.

El test OQ se plantea desde un punto de vista modular y conlleva la definición de los parámetros a determinar y los criterios de aceptación correspondientes, que se establecerán mediante la comparación de los requisitos de usuario y las especificaciones facilitadas por el fabricante.

El test PQ, según el modelo “caja negra”, pretende demostrar el buen funcionamiento de un cromatógrafo de líquidos que se utiliza en un laboratorio de análisis no rutinarios.

3.2. MATERIAL

3.2.1- Equipos

a) Equipos para la OQ

El equipo utilizado para el diseño y aplicación del test OQ es un cromatógrafo HP 1100 con bomba binaria HP 1100 con mezcla a alta presión (G1312A), desgasificador de vacío HP 1100 (G1322A), inyector automático HP 1100 (G1313A), compartimento termostataado para columnas (G1316A) y detector DAD HP 1100 (G1315A), (Ver Figura 3.1).

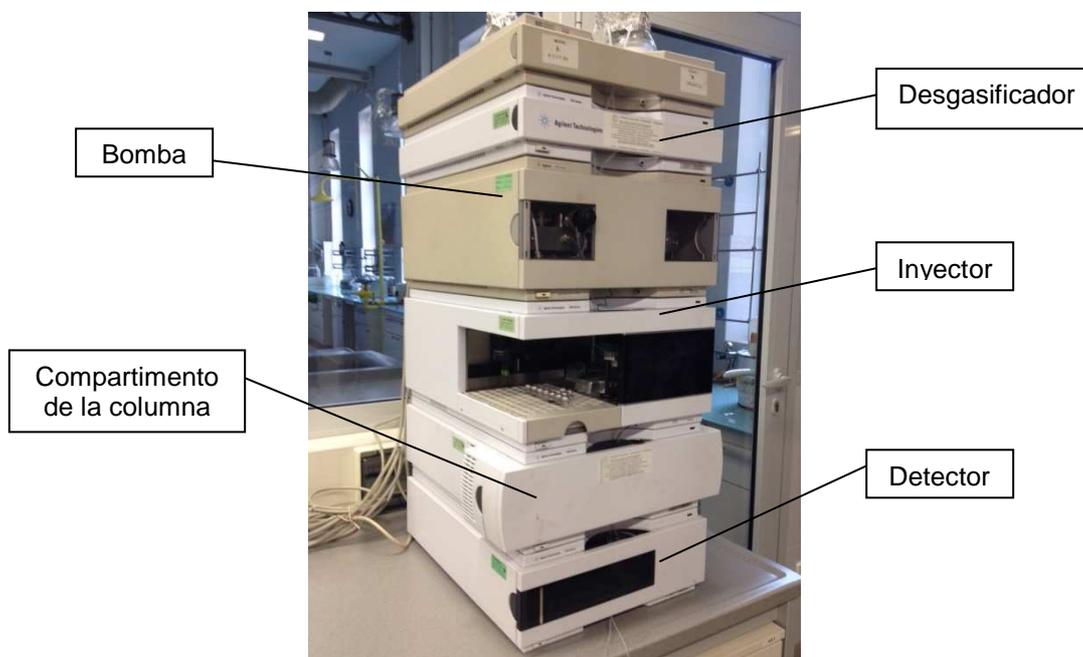


Figura 3.1. Cromatógrafo HP 1100

Las medidas de temperatura se han realizado con una sonda Fluke 52 K/J. La calibración de esta sonda patrón se realiza cada 3 años en laboratorios acreditados.

b) Equipos para la PQ

El equipo utilizado para el diseño y aplicación del test PQ es un cromatógrafo Agilent 1200 con bomba binaria con mezcla a alta presión (G1312B), micro desgasificador de vacío (G1379B), inyector automático y automuestreador (G1367C), compartimiento de temperatura controlada para columnas (G1316B) y detector DAD (G1315C), (Ver Figura 3.2)



Figura 3.2. Cromatógrafo Agilent 1200

c) Condiciones cromatográficas

Las condiciones cromatográficas para OQ y PQ se detallan en la Tabla 3.1.

Condiciones cromatográficas del HPLC	
Columna:	Merck Licroshpher 100 RP-18 (125mm x 4 mm, 5µm)
Volumen de inyección:	20 µL
Temperatura de columna:	308 K
Flujo:	1 mL/min
Fase móvil:	30% agua Milli-Q/70% acetonitrilo
Longitud de onda de detección:	254, 4 nm; Ref: 550, 100 nm

Tabla 3.1. Condiciones cromatográficas HPLC.

La columna que se utiliza para el test es la LiChrospher® 100 RP-18, que es una columna con una gran tradición de fabricación, con una fase estacionaria de sílice y propiedades de fase inversa. Para la producción de la columna LiChrospher® RP-18 se utilizan varios lotes individuales para producir un gran lote ("masterbatch") de la LiChrospher®, alcanzando de esta manera el objetivo de eliminar la variación entre los lotes individuales, algo esencial para ser la columna escogida para el test.

A continuación se detallan las características de la columna LiChrospher® 100 RP-18:

- Características del soporte: partículas de sílice tipo A
- Forma de la partícula: esférica
- Tamaño de las partículas: 5 µm
- Tamaño de poro: 100 Å (10 nm)
- Volumen de poros: 1,25 mL/g
- Superficie específica: 350 m²/g
- Tipo de ligando: Sílice modificada con grupos octadecildimetilsilil
- Densidad de ligando: 3,61 µmol / m²
- Anclaje de ligando: monodentado
- Desactivación: sin (no endcapped)
- Carga de carbono: 21% C
- Rango de pH: 2-7,5
- Eficacia: 55 000 N/m

3.2.2- Reactivos y patrones

a) Reactivos y patrones para OQ

Los patrones utilizados en el test OQ son naftaleno 99% de Fluka y antraceno 96% de Merck. Los reactivos utilizados son acetonitrilo de calidad HPLC gradiente de Merck, acetona de Merck y agua Milli-Q.

La fase móvil (FM) es una mezcla de 30% de agua Milli-Q y 70% de acetonitrilo y se toma como blanco.

La disolución P1 se prepara pesando 1,30 g de naftaleno y 0,050 g de antraceno y diluyendo hasta 100 mL con acetonitrilo. La disolución P2 se prepara diluyendo 5 mL de P1 a 25 mL con acetonitrilo.

Las disoluciones de trabajo de naftaleno y antraceno (D1, D2, D3, D4 y D5) se preparan a partir de la solución P2 utilizando la fase móvil como disolvente. El rango de concentración va desde 260 hasta 3 mg/L para el naftaleno y de 10 hasta 0,1 mg/L para el antraceno (ver Tabla 3.2.a).

Disoluciones	Naftaleno (mg/L)	Antraceno (mg/L)
D1	260	9,99
D2	86,7	3,33
D3	28,9	1,11
D4	9,63	0,37
D5	3,21	0,12

Tabla 3.2.a Disoluciones de trabajo para test OQ.

b) Reactivos y patrones para PQ

Los patrones utilizados en el test PQ son cromato de potasio 99% de Panreac, naftaleno 99% de Fluka, bifenilo 99% de Fluka y trifenilamina 98% de Aldrich. Los reactivos son acetonitrilo de calidad HPLC gradiente de Merck y agua Milli-Q.

La fase móvil (FM) es una mezcla de 30% de agua Milli-Q y 70% de acetonitrilo y se toma como blanco.

La disolución D_{Bifenil} se prepara pesando 80 mg de bifenilo y diluyendo a 100 mL con FM. Las disoluciones de trabajo son:

- D_{Alta} : 100 mg de cromato de potasio, 40 mg de naftaleno y 100 mg de trifenilamina, adición de 20 mL de solución D_{Bifenil} y se diluye a 200 mL con FM.
- D_{Baja} : Dilución de 5 mL de D_{Alta} a 50 mL con FM.

Las concentraciones de los diferentes analitos en las disoluciones de trabajo para el test PQ se resumen en la Tabla 3.2.b.

Analito	D_{Alta}	D_{Baja}
Cromato (mg/L)	500	50
Naftaleno (mg/L)	200	20
Trifenilamina (mg/L)	500	50
Bifenilo (mg/L)	80	8

Tabla 3.2.b Disoluciones de trabajo para test PQ.

3.3. TEST OQ

3.3.1- Parámetros OQ

Los parámetros que forman parte del test OQ se presentan a continuación. El test de la lámpara, la exactitud de flujo, el ruido atribuible a bomba y detector, la exactitud de la composición de la fase móvil y la temperatura del horno se estudian reemplazando la columna cromatográfica por una unión de volumen muerto cero. Sin embargo, para estudiar la repetibilidad de inyección, la linealidad del detector y el efecto memoria (*carryover*) es necesario el uso de la columna cromatográfica.

A continuación se describen los distintos parámetros que conforman el test OQ propuesto en esta tesis y posteriormente se presentan los criterios de aceptación facilitados por las distintas fuentes consultadas.

Test de la lámpara: determina si la lámpara está en condiciones adecuadas para su uso mediante la medición de su intensidad. Se realiza utilizando el software del equipo [Agilent Tech., 2011]. Esta prueba se puede complementar con la verificación de la exactitud de longitud de onda usando un filtro de óxido de holmio.

Exactitud del flujo: evalúa si el flujo es exacto, es decir, si el flujo seleccionado es el que realmente se produce. Para estudiar este parámetro, se hace circular agua Milli-Q a través del sistema cromatográfico dejando libre (sin columna ni unión de volumen muerto) el compartimento de la columna. Se selecciona un flujo y durante un tiempo determinado se recoge el agua que sale del tubo de conexión al sistema de inyección en un Erlenmeyer de 50 mL seco y tardado. Se pesa y se determina el sesgo respecto al valor esperado.

De esta manera, la bomba del cromatógrafo se programa según la Tabla 3.3 para determinar la exactitud del flujo y se realizan dos repeticiones por cada flujo seleccionado.

Flujo	Tiempo de recogida	Canal
1 mL/min	10 min	50 % A / 50 % B (o equivalente según el número de líneas)
2 mL/min	5 min	50 % A / 50 % B (o equivalente según el número de líneas)

Tabla 3.3. Gradiente para determinar la exactitud de flujo.

Nota: Si la bomba fuera cuaternaria se sugiere mezclar un 25% de cada uno de los canales.

Ruido de bomba y detector: evalúa si la señal residual debida a estos dos módulos es adecuada. Para estudiar este parámetro, en lugar de columna se coloca una unión de volumen muerto cero, se hace circular agua Milli-Q a través del sistema cromatográfico con un flujo seleccionado y después, se detiene el flujo. En primer lugar se mide el ruido producido por la bomba y el detector durante 10 minutos, y posteriormente el que corresponde exclusivamente al detector también durante 10 minutos. Este estudio se realiza por duplicado.

Exactitud de la composición de la fase móvil: determina si la composición de la mezcla, que se realiza entre los dos canales del sistema de bombeo, es exacta. Se añade un marcador a uno de los canales y el valor seleccionado en el equipo se compara con el experimental a diferentes porcentajes de este canal. El test de comprobación de la exactitud de la composición de la mezcla para un cromatógrafo de dos líneas (A, B), haciendo circular agua por el canal A y agua con un 0,1% de acetona por el canal B, se realiza según la Tabla 3.4 y la Figura 3.3.

t (min)	% B	t (min)	% B
0,00	0	25,01	90
5,00	0	35,00	90
5,01	10	35,01	100
15,00	10	45,00	100
15,01	50	45,01	0
25,00	50		

Tabla 3.4. Gradiente para determinar la exactitud de composición de la mezcla obtenida con las líneas A y B.

Nota: Si la bomba fuera cuaternaria se repite el ensayo con las líneas C y D.

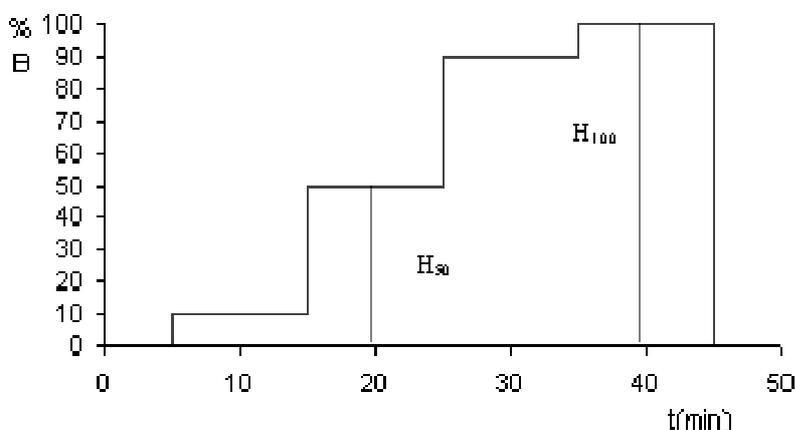


Figura 3.3. Estudio de exactitud de la composición de la fase móvil.

Canal A: Agua Milli-Q; Canal B: Agua Milli-Q + 0,1% acetona (marcador)
 Proporción del eluyente con marcador de 0, 10, 50, 90 y 100% en el Canal B.

La altura de los escalones se mide en centímetros y se utiliza para calcular la exactitud respecto al valor nominal programado. Se utiliza como línea de base la altura del escalón del 0% B (primeros 5 min), y como punto de referencia para el cálculo, la altura del escalón correspondiente al 100% B (H100).

El valor real “B” se calcula según la Ecuación 3.1:

$$B_x = \frac{H_x}{H_{100}} \cdot 100 \quad \text{(Ecuación 3.1)}$$

Exactitud de la temperatura: verifica si la temperatura del horno donde se encuentra la columna se corresponde a la temperatura seleccionada. Se requiere una sonda patrón externa para comparar el valor medido por la sonda y el que marca el cromatógrafo. Una vez se ha alcanzado la temperatura de interés, la sonda se introduce en el horno y se deja estabilizar durante 30 minutos asegurando que la punta de la sonda no queda en contacto con el horno. A continuación, se realiza la medida de temperatura. Este estudio se realiza por duplicado para cada temperatura de interés.

Repetibilidad de inyección: evalúa si la inyección se lleva a cabo con la precisión adecuada. Se determina con la inyección de un patrón 6 veces y el cálculo del coeficiente de variación (CV%) de las áreas de los picos cromatográficos.

Linealidad del detector: evalúa si el detector es lineal en el rango de estudio mediante la inyección de una serie de patrones de distinta concentración. La inyección se realiza de menor a mayor concentración (cada patrón se inyecta por triplicado) y acabando la serie con un blanco. Con los resultados obtenidos se ajusta una recta aplicando el método de mínimos cuadrados y se calcula el coeficiente de determinación (R^2) y, además, se estudia el coeficiente de variación de los factores de respuesta (CV% FR). Cabe destacar que algunos autores presentan como test de linealidad el cálculo de la desviación de la señal correspondiente a patrones con valores de absorbancia de 1,5 o 2,5 AU [Huber, 1997; Waters Corp. (c), 2011]. En la presente tesis, esta opción fue descartada porque se consideró más adecuado realizar el estudio de linealidad considerando la influencia de todos los patrones en el rango establecido.

Carryover: con este parámetro se determina si existe efecto memoria tras la inyección. La influencia del *carryover* se evalúa mediante la inyección de un blanco tras la inyección de un patrón concentrado. Se calcula el valor del porcentaje de la señal residual que se obtiene en el blanco respecto a la señal del patrón.

En la Tabla 3.5 se resumen los criterios de aceptación procedentes de fabricantes y publicaciones que llevan a cabo un test OQ.

PARÁMETROS	REFERENCIAS			
	Agilent	Waters	Accred. Qual. Assur. (Huber)	Accred. Qual. Assur. (Bedson)
Test de la lámpara (221-350 nm)	5000 cuentas	-	-	-
Exactitud de flujo	≤ 5%	± 1%	± 2,5 %	≤ 3%
Ruido de bomba y detector	≤ 0,05 mAU	≤ 0,1 mAU	≤ 0,06 mAU	-
Exactitud de composición de FM	≤ 2%	-	± 1%	-
Exactitud de la temperatura	≤ 2 K	-	± 1 K	± 1 K
Repetibilidad de inyector automático	CV ≤ 2%	CV ≤ 0,5%	CV ≤ 1%	CV ≤ 1%
Linealidad del detector	R ² > 0,999 CV (FR) ≤ 5%	Sesgo% ≤ 5 a 2,5 AU	Sesgo% ≤ 5 a 1,5 AU	-
<i>Carryover</i>	Altura ≤ 0,4% Área ≤ 0,2%	< 0,1%	< 0,3%	-

Tabla 3.5. Criterios de aceptación bibliográficos para el test OQ.

[Agilent Tech., 2011; Waters Corp. (a,b,c), 2011; Huber, 1997; Bedson, 1999]

3.3.2- Secuencia OQ

Antes de empezar el test debe prepararse y acondicionarse el sistema de la siguiente manera:

- Colocar una botella de isopropanol en los canales A y B. En aquellos casos en que haya cuatro canales se seleccionan cantidades equivalentes de isopropanol (25% en cada línea).
- Colocar una pieza de volumen muerto cero en la posición de la columna y programar un flujo de 1 mL/min y una mezcla 50% canal A y 50% canal B (o cantidades equivalentes según las líneas). Se deja estabilizar el sistema unos 15 minutos.
- Una vez transcurrido el tiempo, se coloca agua Milli-Q en todas las líneas.
- De nuevo se programa un flujo de 1 mL/min y una mezcla 50% canal A y 50% canal B y se deja estabilizar otros 15 minutos.

El test OQ se inicia con el estudio de los parámetros que no requieren disoluciones patrón ni columna: test de la lámpara, exactitud de flujo, ruido de la bomba y detector, exactitud de la fase móvil y exactitud de la temperatura. Posteriormente, se inyecta una secuencia de patrones para estudiar la repetibilidad de inyección, la linealidad del detector y el *carryover*. (Tabla 3.6).

Disolución	Número de inyecciones	Parámetro
D5	3	Linealidad del detector
D4	3	Linealidad del detector
D3	6	Repetibilidad de inyección y linealidad del detector
D2	3	Linealidad del detector
D1	3	Linealidad del detector y <i>Carryover</i>
Blanco	1	<i>Carryover</i>

Tabla 3.6. Secuencia de inyección OQ.

3.3.3- Resultados del test OQ

A continuación, para cada uno de los parámetros del test OQ, se presentan los datos históricos procedentes de calibraciones y verificaciones llevadas a cabo en la Sección de Cromatografía de IQS (entre los años 2001 y 2008) y los resultados del test OQ tal y como se ha diseñado en la presente tesis (años 2009 y 2010). Los gráficos de control elaborados incluyen los criterios de aceptación que se han establecido considerando los datos bibliográficos y los resultados experimentales.

La función principal de los gráficos de control es detectar desviaciones respecto a los valores de control del equipo. Una desviación respecto a los límites establecidos puede significar que el equipo no se encuentra en las condiciones adecuadas para realizar los análisis [Masson, 2007].

a) Test de la lámpara

El resultado del test de la lámpara de los años 2009 y 2010 se muestra en la Tabla 3.7. Para este test no hay datos históricos.

	OQ 2009	OQ 2010
Test de la lámpara	7444 cuentas (221-350 nm)	15889 cuentas (221-350 nm)

Tabla 3.7. Resultados del test OQ correspondientes a 2009 y 2010.

El criterio de aceptación es propio de cada modelo de lámpara y lo proporciona el fabricante. En este caso debe ser superior a 5000 cuentas en el rango de interés (221-350 nm).

Esta prueba controla que la intensidad de la lámpara es adecuada. Si no se cumple con el criterio de aceptación, la lámpara debe ser reemplazada por una nueva. En particular, durante el mantenimiento de 2010 se produjo un cambio de lámpara, de ahí que el valor de 2010 sea notablemente superior a 2009.

b) Exactitud de flujo

Los resultados de la exactitud de flujo obtenidos entre 2001 y 2010 se presentan en la Tabla 3.8, indicando, en valor absoluto, el porcentaje de desviación obtenido respecto a los valores de flujo seleccionados de 1 y 2 mL/min. Los criterios de aceptación bibliográficos para este parámetro se pueden observar en la Tabla 3.9. Con el histórico de resultados se construye la carta de control de la Figura 3.4.

	Exactitud de flujo	
	1 mL/min	2 mL/min
OQ 2001	0,94%	0,49%
OQ 2002	0,48%	0,18%
OQ 2003	0,02%	0,31%
OQ 2005	0,44%	0,15%
OQ 2006	1,68%	2,70%
OQ 2008	1,20%	0,80%
OQ 2009	0,62%	0,65%
OQ 2010	1,10%	0,85%

Tabla 3.8. Resultados de la exactitud de flujo (expresado como % de desviación).

	Exactitud de flujo
Agilent	≤ 5%
Waters	± 1%
Quality Assur. and Accred (Huber)	± 2,5%
Acres. Qual. Assur. (Bedson)	≤ 3%

Tabla 3.9. Criterios de aceptación para la exactitud de flujo.

[Agilent Tech., 2011; Waters Corp. (a), 2011; Huber, 1997; Bedson, 1999]

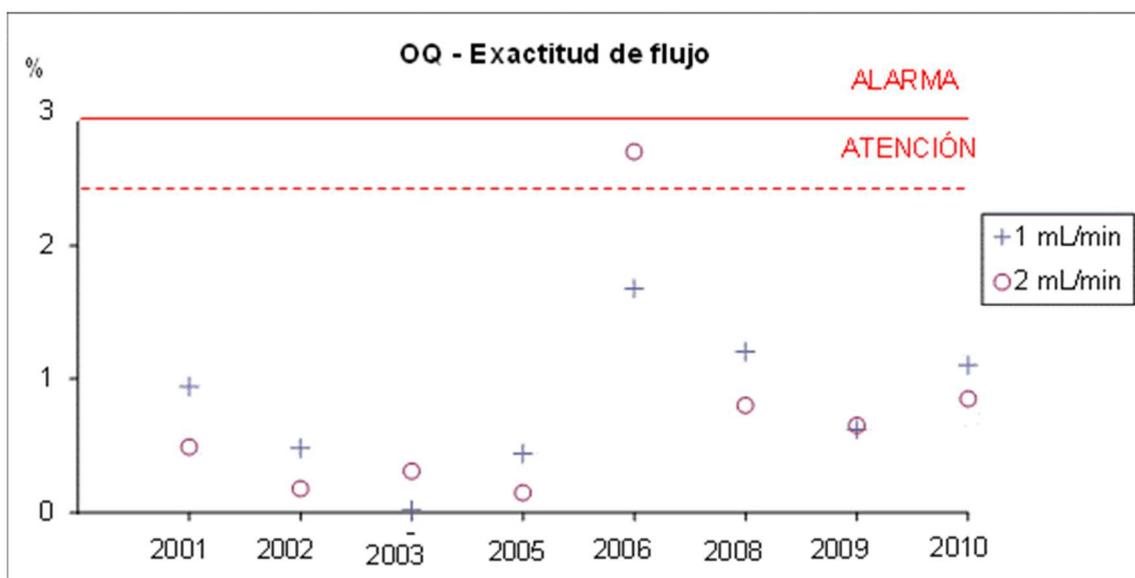


Figura 3.4. Carta de control de exactitud de flujo.

Los gráficos de control muestran la variabilidad de los resultados con el tiempo. Además, permiten detectar tendencias que pueden ayudar a prever problemas en el equipo. En estos gráficos de control, se puede distinguir dos marcas: ATENCIÓN, en el que el equipo todavía funciona correctamente, pero se aconseja una revisión del módulo y ALARMA, en la que el equipo no está en buen estado para su uso ya que los resultados de OQ no cumplen con el criterio de aceptación.

Los criterios de aceptación consultados bibliográficamente, para el estudio de la exactitud de flujo, presentan valores notablemente diferentes entre ellos. Se decide escoger, como criterio de ALARMA que el porcentaje de desviación sea $\leq 3\%$. Según los resultados históricos, este valor parece el más adecuado, descartando criterios que pueden considerarse demasiado amplios. Como valor de ATENCIÓN se establece 2,5%, que será ligeramente inferior al 3% y es el valor recomendado dado por una de las fuentes bibliográficas consultadas.

Todos los resultados obtenidos están por debajo del nivel de ALARMA y sólo el valor del porcentaje de desviación correspondiente al año 2006, para el valor de flujo seleccionado de 2 mL/min, supera el nivel de ATENCIÓN.

c) Ruido de bomba y detector

Los resultados del ruido atribuible a la bomba y al detector se presentan en la Tabla 3.10. Tal y como se ha indicado anteriormente, experimentalmente se obtienen los valores del “ruido de bomba + detector” y del “ruido del detector” al parar la bomba, obteniéndose el “ruido de la bomba” por diferencia. Los criterios de aceptación consultados se presentan en la Tabla 3.11 y son para bomba y detector por separado. La carta de control del ruido de la bomba y el detector se muestra en la Figura 3.5.

	Ruido de la bomba (mAU)	Ruido del detector (mAU)
OQ 2001	0,010	0,013
OQ 2002	0,016	0,012
OQ 2003	0,022	0,025
OQ 2005	0,050	0,060
OQ 2006	0,020	0,009
OQ 2008	0,015	0,009
OQ 2009	0,012	0,025
OQ 2010	0,014	0,023

Tabla 3.10. Resultados del ruido de bomba y detector.

	Ruido de bomba/detector
Agilent	≤ 0,05 mAU
Waters	≤ 0,1 mAU
Quality Assur. and Accred.(Huber)	≤ 0,06 mAU
Acred. Qual. Assur. (Bedson)	-

Tabla 3.11. Criterios de aceptación para el ruido de bomba y detector.

[Agilent Tech., 2011; Waters Corp. (a,c), 2011; Huber, 1997]

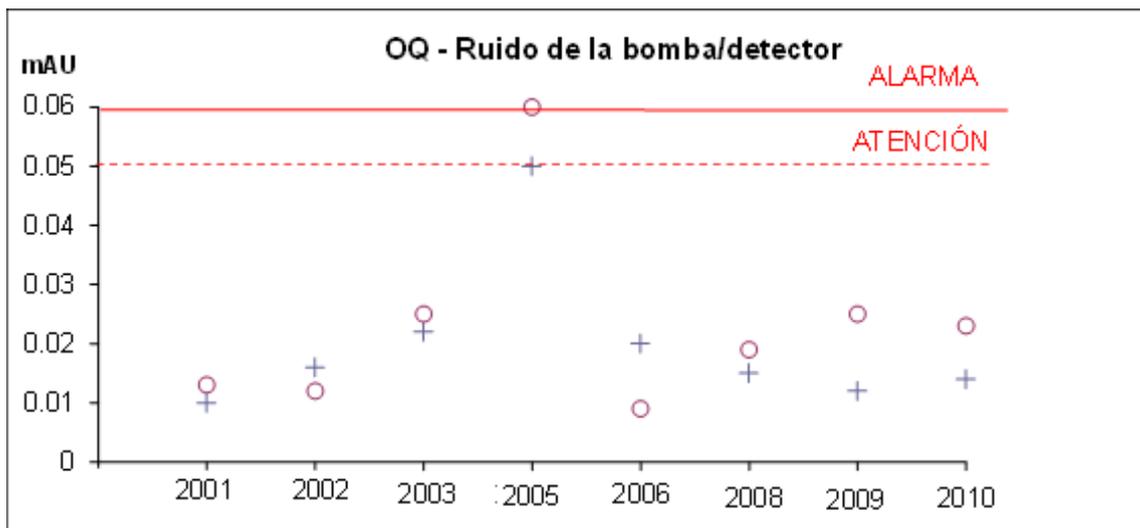


Figura 3.5. Carta de control del ruido de la la bomba (+) y detector (o).

Como se observa en los resultados obtenidos, el ruido de bomba y detector acostumbran a comportarse de forma similar.

A la vista de los resultados históricos, y teniendo en cuenta que dos de las fuentes bibliográficas consultadas presentan valores prácticamente coincidentes, se decide establecer un criterio de aceptación de 0,06 mAU para la señal ALARMA y 0,05 mAU para la señal ATENCIÓN, valores coherentes con los resultados históricos y recomendados por fuentes bibliográficas.

En relación a los resultados correspondientes al año 2005, los valores obtenidos para el ruido de la bomba y detector alcanzan los valores de ATENCIÓN y ALARMA, respectivamente. No obstante, debido a que en aquel momento el criterio de aceptación era 0,1%, el resultado se consideró correcto.

d) Exactitud de la composición de la fase móvil

Los resultados de la composición de la fase móvil (FM) para los valores seleccionados de 10, 50 y 90% del canal B se presentan en la Tabla 3.12. Los criterios de aceptación consultados se pueden observar en la Tabla 3.13. La carta de control a 50% se presenta, a modo de ejemplo, en la Figura 3.6.

	Exactitud de la composición de la fase móvil		
	10%	50%	90%
OQ 2001	9,8%	50,0%	89,5%
OQ 2002	10,1%	50,2%	90,1%
OQ 2003	9,9%	50,0%	90,1%
OQ 2005	10,1%	50,1%	90,1%
OQ 2006	9,6%	49,8%	89,7%
OQ 2008	10,2%	50,2%	90,2%
OQ 2009	10,0%	49,2%	89,2%
OQ 2010	9,9%	50,2%	89,7%

Tabla 3.12. Resultados de la exactitud de la composición de la FM.

Exactitud de la composición de la FM	
Agilent	≤ 2%
Waters	-
Quality Assur. and Accred.(Huber)	± 1%
Acred. Qual. Assur. (Bedson)	-

Tabla 3.13. Criterios de aceptación para la exactitud de composición de la fase móvil.
(En valor absoluto)

[Agilent Tech., 2011; Huber, 1997]

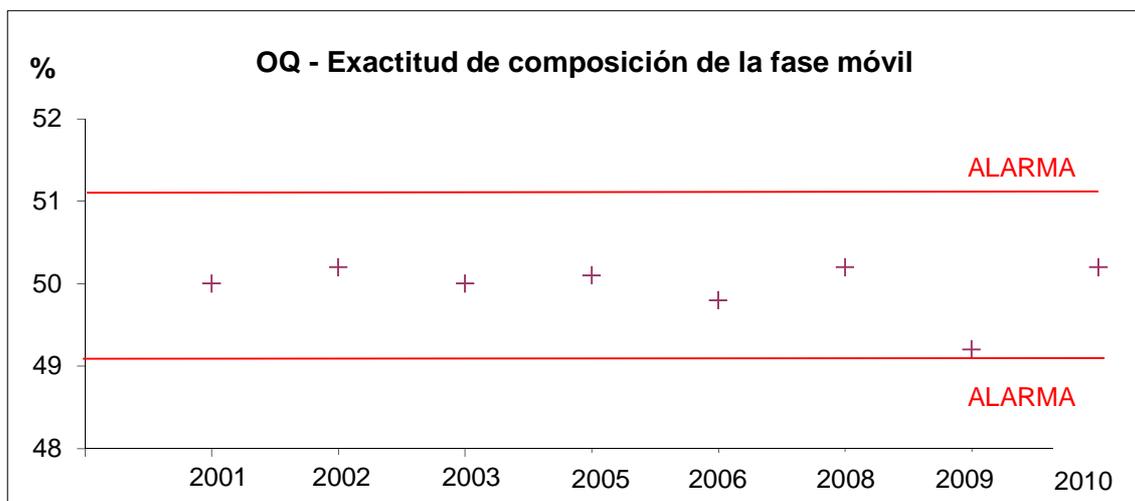


Figura 3.6. Carta de control de la exactitud de la fase móvil al 50%.

Como se observa en la Tabla 3.12 ninguna de las desviaciones es mayor al 1%. Así, un criterio de aceptación del 1% se considera adecuado, ya que variaciones mayores de la composición provocan cambios sustanciales en los tiempos de retención [Bolliet, 1998; Greibrokk, 2003]. Dada la criticidad del parámetro, en este caso sólo se establece el criterio de ALARMA.

e) Exactitud de la temperatura

El estudio de este parámetro se inició en el año 2005 y en la Tabla 3.14 se presentan los resultados obtenidos para la temperatura del horno. Los criterios de aceptación consultados se pueden observar en la Tabla 3.15.

	Temperatura (K)	
OQ 2005	T(313 K): 312,1 K	T(353 K): 349,0 K
OQ 2006	T(313 K): 312,3 K	T(353 K): 349,3 K
OQ 2008	-	
OQ 2009	T(308 K): 307,5 K	
OQ 2010	T(308 K): 307,0 K	

Tabla 3.14. Resultados de la temperatura del horno.

	Temperatura
Agilent	≤ 2 K (T=313 K) / ≤ 3 K (T=353 K)
Waters	-
Quality Assur. and Accred. (Huber)	± 1 K
Acred. Qual. Assur. (Bedson)	± 1 K

Tabla 3.15. Criterios de aceptación de la temperatura del horno.

[Agilent Tech., 2011; Huber, 1997; Bedson, 1999]

Una variación de un Kelvin en la temperatura provoca un cambio de menos del 1% en el tiempo de retención de las sustancias de la mezcla. Por tanto, el criterio de aceptación de 1 K se considera demasiado exigente y se siguen las directrices de Agilent para escoger el criterio de aceptación. Es decir, se establece que como máximo la desviación de la temperatura sea de 2 K teniendo en cuenta que las condiciones de trabajo están fijadas a 313 K.

f) Repetibilidad del inyector

Los resultados de la repetibilidad de inyectar 6 veces el patrón de antraceno, estimado como coeficiente de variación de su área, se presentan en la Tabla 3.16. Los criterios de aceptación de repetibilidad de inyección consultados se encuentran en la Tabla 3.17. Con el histórico de resultados y los criterios de aceptación se construye la carta de control de la Figura 3.7.

Repetibilidad del inyector (CV% área)	
OQ 2001	0,08
OQ 2002	0,07
OQ 2003	0,07
OQ 2005	0,07
OQ 2006	1,22
OQ 2008	0,08
OQ 2009	0,04
OQ 2010	0,08

Tabla 3.16. Resultados de repetibilidad de la inyección.

Repetibilidad de inyección	
Agilent	CV% ≤ 2
Waters	CV% ≤ 0,5
Quality Assur. and Accred.(Huber)	CV% ≤ 1
Acred. Qual. Assur. (Bedson)	CV% ≤ 1

Tabla 3.17. Criterios de aceptación para la repetibilidad de inyección.

[Agilent Tech., 2011; Waters Corp. (b), 2011; Huber, 1997; Bedson, 1999]

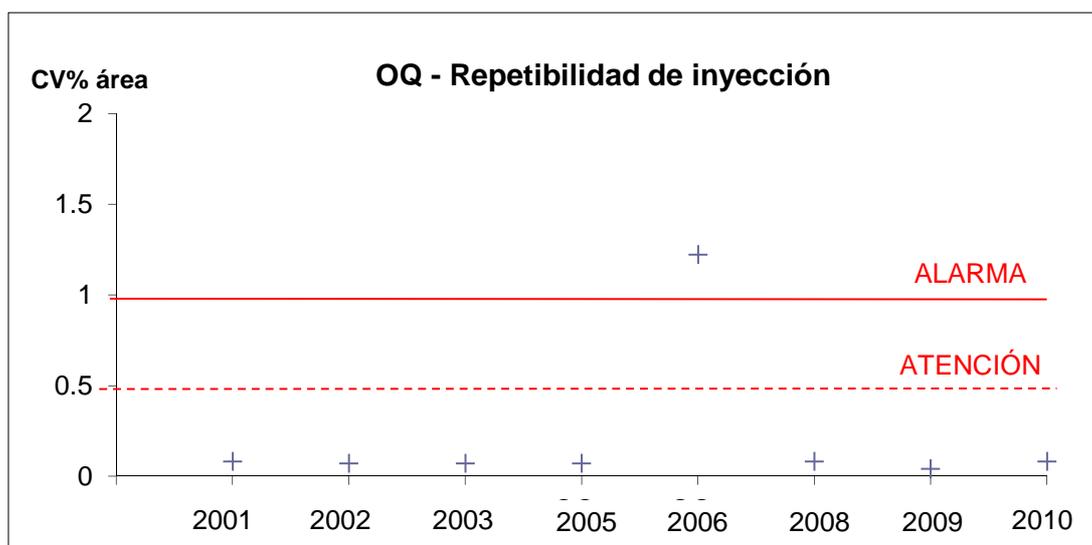


Figura 3.7. Carta de control para la repetibilidad de inyección.

Al observar los resultados de repetibilidad de inyección, el valor correspondiente al 2006 destaca respecto a los demás resultados. Además, no cumple con el criterio de aceptación de tres de las cuatro fuentes consultadas. No obstante, el criterio vigente en aquel momento era 2% y por ello el valor se consideró como aceptable. Como se observa, en los años posteriores se obtienen valores de repetibilidad inferiores al 0,1%.

A la vista de los resultados históricos, y de acuerdo con las fuentes bibliográficas consultadas, se decide establecer un criterio de aceptación de 1% para la marca ALARMA y un valor de 0,5% como ATENCIÓN.

g) Linealidad del detector

Los resultados de linealidad correspondientes a la inyección de antraceno se muestran en la Tabla 3.18. Se detallan los resultados obtenidos de coeficiente de determinación (R^2) y del coeficiente de variación de los factores de respuesta (CV% FR). En la Tabla 3.19 se presentan los criterios de aceptación bibliográficos. La carta de control de la linealidad del detector en la que se presentan los coeficientes de variación de los factores de respuesta se puede observar en la Figura 3.8.

	Linealidad del detector	
	R^2	CV% FR
OQ 2001	0,9999	1,4
OQ 2002	0,9999	1,3
OQ 2003	0,9999	1,4
OQ 2005	0,9999	2,4
OQ 2006	0,9999	1,9
OQ 2008	0,9998	1,4
OQ 2009	0,9998	4,6
OQ 2010	0,9999	1,2

Tabla 3.18. Resultados de la linealidad del detector.

	Linealidad del detector
Agilent	$R^2 > 0,999 / CV\% FR \leq 5$
Waters	Desviación% ≤ 5 a 2,5 AU
Quality Assur. and Accred.(Huber)	Desviación% ≤ 5 a 1,5 AU
Acred. Qual. Assur. (Bedson)	-

Tabla 3.19. Criterios de aceptación para la linealidad del detector.

[Agilent Tech., 2011; Waters Corp. (c), 2011; Huber, 1997]

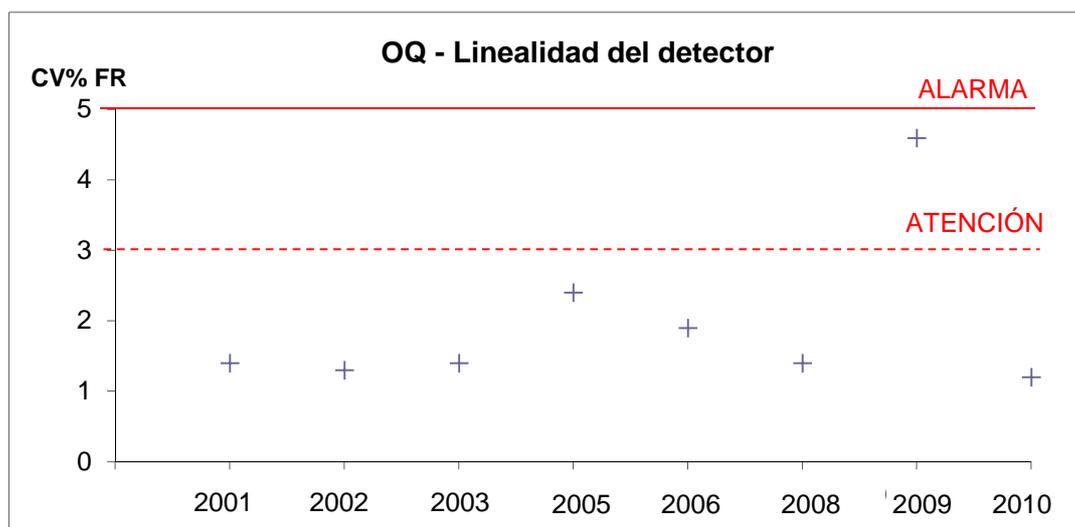


Figura 3.8. Carta de control para la linealidad del detector.

El CV% FR proporciona información mucho más relevante que R^2 , ya que como puede observarse en la Tabla 3.18, no hay diferencias notables entre los valores de R^2 .

De acuerdo con la bibliografía consultada, el valor establecido como ALARMA para el coeficiente de variación de los factores de respuesta (CV% FR) es inferior o igual a 5% y, a la luz de los resultados obtenidos, se define la línea de ATENCIÓN al valor de 3%.

h) Carryover

El resultado obtenido para el *carryover* % de altura de blanco respecto a altura de D1 el año 2010 se presenta en la Tabla 3.20. No se dispone de resultados históricos de este parámetro ya que anteriormente no se realizaba. Los criterios de aceptación bibliográficos se presentan en la Tabla 3.21.

	Naftaleno	Antraceno
D1 (mAU)	1057	714
Blanco (mAU)	*	0,023
Blanco/D1(%)	*	0,003

* Por debajo del límite de detección

Tabla 3.20. Resultados de *carryover*.

	<i>Carryover</i>
Agilent	Altura ≤ 0,4% / Área ≤ 0,2%
Waters	< 0,1%
Quality Assur. and Accred.(Huber)	< 0,3%
Acred. Qual. Assur. (Bedson)	-

Tabla 3.21. Criterio de aceptación para el *carryover*.
[Agilent Tech., 2011; Waters Corp. (c), 2011; Huber, 1997]

A la vista de los resultados obtenidos y con el objetivo de no ser excesivamente estrictos ni escoger un criterio excesivamente amplio, se establece el valor de 0,2 % como valor de ALARMA y 0,1% como valor de ATENCIÓN.

3.3.4- Resumen de resultados

Los resultados correspondientes a la aplicación del test OQ en el año 2010 y los valores mínimos y máximos obtenidos desde 2001 hasta 2010 se presentan en la Tabla 3.22.

PARÁMETROS	RESULTADOS			
	OQ 2010	Mínimo (2001-2010)	Máximo (2001-2010)	
Test de la lámpara (221-350 nm)	15889 cuentas	7444 cuentas (2009)	15889 cuentas (2010)	
Exactitud de flujo	1 mL/min	1,1%	0,02% (2003)	1,7% (2006)
	2 mL/min	0,85%	0,15% (2005)	2,7% (2006)
Ruido	Bomba	0,014 mAU	0,010 mAU (2001)	0,050 mAU(2005)
	Detector	0,023 mAU	0,009 mAU (2006)	0,060 mAU (2005)
Exactitud de la fase móvil	10%	0,1%	<0,1% (2009)	0,4% (2006)
	50%	0,2%	<0,1% (2003)	0,8% (2009)
	90%	0,3%	0,1% (2005)	0,8% (2009)
Exactitud de la temperatura		1,0 K	0,5 K (2009)	1,0 K (2010)
Repetibilidad de inyección	CV	0,08%	0,04% (2009)	1,2% (2006)
Linealidad del detector	R ²	0,9999	0,9997	0,9999
	RSD FR	1,2%	1,2% (2010)	4,6% (2009)
<i>Carryover</i>	Naftaleno	0,01%	-	-
	Antraceno	0,02%	-	-

Tabla 3.22. Resultados del test OQ.

3.3.5- Discusión de resultados

El test OQ se ha diseñado para asegurar el buen funcionamiento del cromatógrafo de líquidos de acuerdo con los requisitos especificados por el fabricante y el laboratorio. La OQ propuesta para un cromatógrafo de líquidos se basa en una serie de pruebas que permite evaluar cada uno de sus módulos (bomba, inyector, horno y detector). Para establecer unos criterios de ALARMA y ATENCIÓN adecuados a las necesidades del laboratorio, se utilizan los valores bibliográficos y los recomendados por los fabricantes, adaptados según los resultados históricos de las calibraciones del equipo. Los criterios de ALARMA y ATENCIÓN establecidos para el test OQ se resumen en la Tabla 3.23.

	ALARMA	ATENCIÓN
Test de la lámpara	> 5000 cuentas	-
Exactitud de flujo	≤ 3%	≤ 2,5%
Ruido de bomba/detector	≤ 0,06 mAU	≤ 0,05 mAU
Exactitud de FM	≤ 1%	-
Temperatura	≤ 2 K	-
Repetibilidad de inyección	CV% área ≤ 1	CV% área ≤ 0,5
Linealidad de detector	CV% FR ≤ 5	CV% FR ≤ 3
<i>Carryover</i>	≤ 0,2%	≤ 0,1%

Tabla 3.23. Criterios de aceptación OQ.

Es necesario disponer de una columna reservada únicamente para la evaluación de los siguientes parámetros del test OQ: repetibilidad del inyector, linealidad del detector y *carryover*. De esta manera, se evita que otros análisis puedan influir en los resultados o alterar la columna.

El uso de cartas de control permite detectar de forma rápida y visual las tendencias del equipo. Establecer marcas de ATENCIÓN y actuar cuando los resultados se aproximen a ellas, permite anticiparse y llevar a cabo acciones preventivas que subsanen posibles fallos del equipo, antes de que quede fuera de uso. Resultados que no cumplen los límites de ALARMA establecidos conllevan la realización de actividades de mantenimiento correctivas y la cualificación posterior del equipo.

En definitiva, una planificación adecuada de las actividades de cualificación proporciona confianza en los resultados obtenidos con el equipo. Esta propuesta será ventajosa, incluso desde el punto de vista económico, ya que evitará posibles fallos en el equipo y evitará resultados erróneos.

3.4. TEST PQ

3.4.1- Parámetros PQ

El test PQ se ha diseñado desde un punto de vista de “caja negra” y se basa en la inyección de una mezcla de sustancias en unas condiciones cromatográficas específicas y utilizando una columna exclusiva para el test. Las sustancias escogidas para diseñar el test no deben reaccionar entre ellas o con los disolventes, y además, con el objetivo de que el test no lleve mucho tiempo, deben eluirse bastante rápido. Tras realizar el estudio con diferentes sustancias, se decidió que una mezcla con cromato de potasio, naftaleno, bifenilo y trifenilamina eran las más adecuadas para formar parte del test PQ. El cromato permite determinar el tiempo básico. El naftaleno y el bifenilo son dos hidrocarburos aromáticos que se eluyen a tiempos de retención parecidos (t_r). La trifenilamina es un producto que, debido al carácter básico del grupo amina, tiene diferentes características que los hidrocarburos y se comportará de forma diferenciada a cambios de temperatura o cambios de fase móvil. Se utilizan dos disoluciones para realizar el test: disolución a alta concentración y disolución a baja concentración.

La Figura 3.9 presenta un cromatograma de la inyección de la disolución a baja concentración.

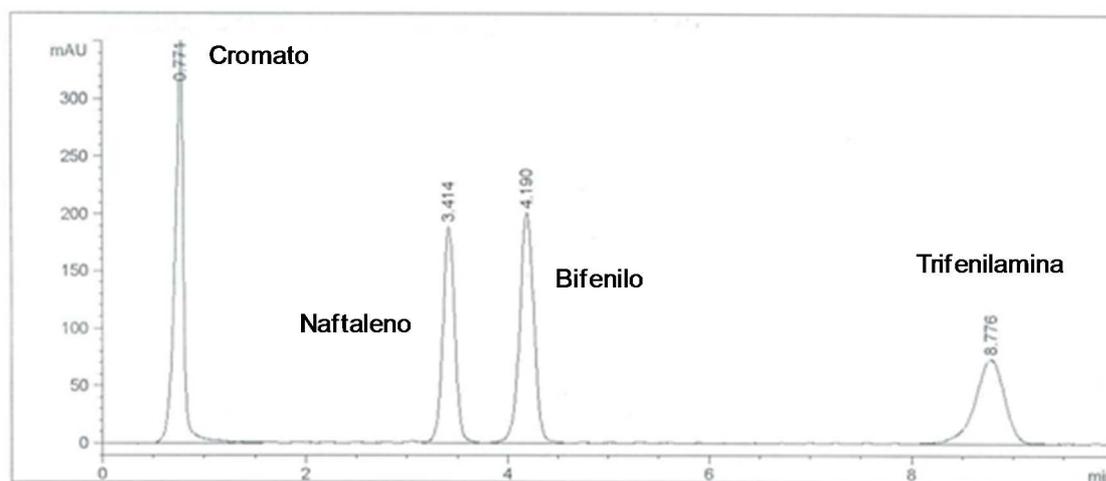


Figura 3.9. Cromatograma de la inyección de la disolución a baja concentración del test PQ.

Los parámetros definidos para el test PQ son los siguientes:

- Variación de los tiempos de retención de cromato, naftaleno, bifenilo y trifenilamina respecto al valor de referencia ($\Delta t_r\%$).
- Variación del factor de retención de la trifenilamina respecto al valor de referencia ($\Delta k_{\text{Trifenilamina}}$).
- Coeficiente de variación de las alturas del naftaleno y del bifenilo (CV%).
- Variación del factor de respuesta del bifenilo a alta concentración respecto a baja concentración ($\Delta FR\%$).
- Altura del naftaleno y del bifenilo en el blanco respecto a las alturas de un patrón a alta concentración previamente inyectado ($h_{\text{Blanco}}/h_{\text{Alta}}\%$).

Los tiempos de retención (t_r) y las alturas de los picos (h) son los datos primarios con los cuales se calculan los parámetros del test PQ. Cabe destacar que para la aplicación del test, es necesario establecer los valores de referencia de los tiempos de retención del cromato, naftaleno, bifenilo y trifenilamina y el valor de referencia del factor de retención de la trifenilamina.

Estos parámetros permiten evaluar el correcto funcionamiento del cromatógrafo. Por un lado, la variación de los tiempos de retención y la variación de factor de retención dan información sobre si el flujo, la composición de la fase móvil o la temperatura han variado respecto a sus condiciones normales de trabajo. Por otro lado, la variación del coeficiente de variación de las alturas, la variación en el factor de respuesta y el *carryover* proporcionan información sobre si el funcionamiento del inyector y del detector han variado respecto a sus condiciones normales de trabajo. (Ver Tabla 3.24).

Parámetros	Descripción	Relacionado con
$\Delta t_r\%$	Variación de los tiempos de retención de cromato, naftaleno, bifenilo y trifenilamina respecto al valor de referencia	Flujo de la bomba Temperatura del horno Composición de la FM
$\Delta k_{\text{Trifenilamina}}$	Variación del factor de retención de la trifenilamina respecto al valor de referencia	Temperatura del horno Composición de la FM
CV%	Coeficiente de variación de las alturas del naftaleno y del bifenilo	Repetibilidad de inyección
$\Delta FR\%$	Variación del factor de respuesta del bifenilo a alta concentración respecto a baja concentración	Linealidad del detector
$h_{\text{Blanco}}/h_{\text{Alta}}\%$	Altura del naftaleno y del bifenilo en el blanco respecto a las alturas de un patrón a alta concentración previamente inyectado	<i>Carryover</i>

Tabla 3.24. Parámetros del test PQ.

La verificación de la adecuación del test PQ diseñado se ha llevado a cabo en dos etapas: la primera está relacionada con los parámetros relacionados con los tiempos de retención ($\Delta t_r\%$ and $\Delta k_{\text{Trifenilamina}}$) y la segunda con los parámetros relacionados con las alturas de pico (CV%, $\Delta FR\%$ and $h_{\text{Blanco}}/h_{\text{Alta}}\%$).

3.4.2- Parámetros relacionados con los tiempos de retención

En este primer bloque, se modifican intencionadamente las condiciones que pueden provocar cambios sustanciales en los tiempos de retención (flujo, temperatura y composición de fase móvil). Se evalúa, en cada caso, la influencia en los valores de $\Delta t_r\%$ y $\Delta k_{\text{Trifenilamina}}$ obtenidos.

a) Flujo

Los resultados obtenidos para t_r , $\Delta t_r\%$ y $\Delta k_{\text{Trifenilamina}}$ en función del valor del flujo se muestran en la Tabla 3.25. Los valores de t_r y $k_{\text{Trifenilamina}}$ a 1 mL/min de flujo se toman como valores de referencia en el cálculo del $\Delta t_r\%$ y $\Delta k_{\text{Trifenilamina}}$.

Sustancias	Parámetro	Flujo (mL/min)				
		0,980 (2%)	0,990 (1%)	1,000	1,010 (1%)	1,020 (2%)
Cromato	t_r (min)	0,661	0,655	0,649	0,641	0,636
	$\Delta t_r\%$	1,8%	0,92%		-1,2%	-2,0%
Naftaleno	t_r (min)	3,186	3,155	3,124	3,092	3,061
	$\Delta t_r\%$	2,0%	1,0%		-1,0%	-2,0%
Bifenilo	t_r (min)	3,931	3,893	3,855	3,815	3,777
	$\Delta t_r\%$	2,0%	1,0%		-1,0%	-2,0%
Trifenilamina	t_r (min)	8,610	8,525	8,446	8,355	8,268
	$\Delta t_r\%$	1,9%	0,9%		-1,1%	-2,1%
	$k_{\text{Trifenilamina}}$	12,0	12,0	12,0	12,0	12,0
	$\Delta k_{\text{Trifenilamina}}$	<0,1	<0,1		<0,1	<0,1

Tabla 3.25: t_r , $\Delta t_r\%$, $k_{\text{Trifenilamina}}$ y $\Delta k_{\text{Trifenilamina}}$ en función del flujo.

Tal y como era de esperar, un porcentaje de variación de flujo determinado se traduce en un $\Delta t_r\%$ del mismo orden para todas las sustancias, incluido el anión cromato.

Por ejemplo, un cambio en el flujo del 2% se traduce en un Δt_r del 2%. Por otra parte, en todas las experiencias el valor de $k_{\text{Trifenilamina}}$ permanece constante con lo que $\Delta k_{\text{Trifenilamina}}$ tiene en todos los casos valores próximos a cero.

b) Temperatura

Los resultados obtenidos para t_r , $\Delta t_r\%$ y $\Delta k_{\text{Trifenilamina}}$ en función de la temperatura se presentan en la Tabla 3.26. Los valores de t_r y $k_{\text{Trifenilamina}}$ a 308 K se toman como valores de referencia para el cálculo del $\Delta t_r\%$ y $\Delta k_{\text{Trifenilamina}}$.

Sustancias	Parámetros	Temperatura (K)				
		304	306	308	310	312
Cromato	t_r (min)	0,651	0,650	0,649	0,648	0,647
	Δt_r %	0,31%	0,15%		-0,15%	-0,31%
Naftaleno	t_r (min)	3,205	3,172	3,124	3,080	3,034
	Δt_r %	2,6%	1,5%		-1,4%	-2,9%
Bifenilo	t_r (min)	3,967	3,921	3,855	3,794	3,731
	Δt_r %	2,9%	1,7%		-1,6%	-3,2%
Trifenilamina	t_r (min)	8,791	8,638	8,446	8,252	8,061
	Δt_r %	4,1%	2,3%		-2,3%	-4,6%
	$k_{\text{Trifenilamina}}$	12,5	12,3	12,0	11,7	11,5
	$\Delta k_{\text{Trifenilamina}}$	0,5	0,3		-0,3	-0,5

Tabla 3.26 t_r , Δt_r % y $\Delta k_{\text{Trifenilamina}}$ en función de la temperatura.

Al aumentar la temperatura, para el anión cromato se intuye una disminución en su t_r (Δt_r % del 0,6% entre los valores extremos), mientras que los tiempos de retención de los otros picos disminuyen notablemente (Δt_r % del 6 al 9%, entre los valores extremos). Por otro lado, el efecto de la temperatura ocasiona pequeñas modificaciones en $k_{\text{Trifenilamina}}$ que suponen variaciones de $\Delta k_{\text{Trifenilamina}}$ inferiores a 0,5. Tal y como era de esperar, la retención de las sustancias varía en función de la temperatura de la columna [Bolliet, 1998; Greibrokk, 2003].

c) Composición de la fase móvil

Los resultados que se obtienen para t_r , Δt_r % y $\Delta k_{\text{Trifenilamina}}$ al variar la composición de la mezcla de acetonitrilo y agua Milli-Q (%ACN/%H₂O) se presentan en la Tabla 3.27. Los valores de t_r y $k_{\text{Trifenilamina}}$ a 70%ACN/30%H₂O se toman como valores de referencia en el cálculo del Δt_r % y $\Delta k_{\text{Trifenilamina}}$.

Sustancias	Parámetros	Composición de la fase móvil (%ACN/%H ₂ O)				
		66/34	68/32	70/30	72/28	74/26
Cromato	t_r (min)	0,648	0,650	0,649	0,651	0,652
	Δt_r %	-0,15%	0,15%		0,31%	0,46%
Naftaleno	t_r (min)	3,682	3,382	3,124	2,895	2,689
	Δt_r %	17,9%	8,3%		-7,3%	-0,13
Bifenilo	t_r (min)	4,714	4,247	3,855	3,512	3,209
	Δt_r %	22,3%	10,2%		-8,9%	-16,8%
Trifenilamina	t_r (min)	11,345	9,747	8,446	7,344	6,406
	Δt_r %	34,3%	15,4%		-13,0	-24,2%
	$k_{\text{Trifenilamina}}$	16,5	14,0	12,0	10,3	8,8
	$\Delta k_{\text{Trifenilamina}}$	4,5	2,0		-1,7	-3,2

Tabla 3.27. t_r , Δt_r % y $\Delta k_{\text{Trifenilamina}}$ en función de la composición de la FM.

Al variar la composición de la fase móvil, el cromato potásico prácticamente no experimenta variación de su t_r (Δt_r % próximos a cero). Sin embargo, los Δt_r % de las demás sustancias (naftaleno, antraceno y trifenilamina) son aún mayores que en el caso de la temperatura. Cabe destacar la gran influencia de la composición de la fase móvil en los valores de $\Delta k_{\text{Trifenilamina}}$, con valores comprendidos entre -3,2 y 4,5.

En resumen, si el valor de la variación del tiempo de retención no es superior a 2%, queda garantizado que el flujo no ha cambiado más de 2% (Tabla 3.25), que la temperatura del horno no ha variado más de 2K (Tabla 3.26) y que la composición de la fase móvil no ha cambiado más de 1% (Tabla 3.27).

Si los cambios en la variación del factor de retención de la trifenilamina ($\Delta k_{\text{Trifenilamina}}$) son inferiores a 0,5, se puede asegurar que la temperatura no ha variado más de 4K (Tabla 3.26) y que la composición de la fase móvil no ha cambiado más de 1% (Tabla 3.27).

3.4.3- Parámetros relacionados con las alturas

En este segundo bloque, las alturas se utilizan para el cálculo de los parámetros del test PQ que permiten controlar la repetibilidad del inyector, la linealidad del detector y el *carryover*.

a) Repetibilidad del inyector

El coeficiente de variación (CV%) de las alturas del naftaleno y del bifenilo, correspondiente a cinco inyecciones de la disolución a baja concentración, permite el cálculo de la repetibilidad del inyector.

b) Linealidad del detector

El incremento de los factores de respuesta ($\Delta FR\%$) correspondiente al bifenilo, según se expresa en la Ecuación 3.2, se ha establecido como parámetro del test PQ. La relación entre factores de respuesta, obtenidos al inyectar la mezcla a dos niveles de concentración, determina si el detector sigue conservando su linealidad para una longitud de onda de 254 nm.

$$\Delta FR\% = \frac{\frac{C_{Alta}}{Altura_{Alta}} - \frac{C_{Baja}}{Altura_{Baja}}}{\frac{C_{Baja}}{Altura_{Baja}}} 100 \quad (\text{Ecuación 3.2})$$

En el estudio de la linealidad, se trabaja a un valor de concentración C_{Alta} que se encuentra en el límite superior en el que el detector conserva su linealidad. Así, si aumentara la señal de fondo, la absorbancia que se obtendría para C_{Alta} entraría en la zona no lineal. Para determinar estos niveles de concentración, se realizó un estudio previo con naftaleno y bifenilo (Figura 3.10). La mayor sensibilidad del detector para el bifenilo hace que sea la sustancia utilizada en el estudio de linealidad.

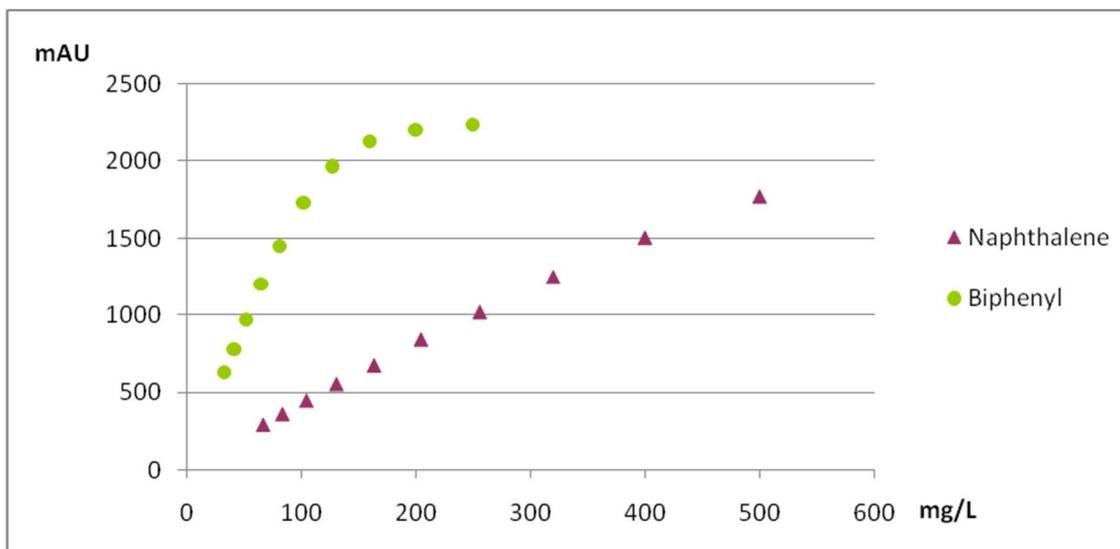


Figura 3.10. Estudio de linealidad de naftaleno y bifenilo.

Para establecer el criterio de aceptación de $\Delta FR\%$ se tiene en cuenta el test de proporcionalidad, muy utilizado para evaluar la linealidad de métodos cromatográficos [AEFI, 2001]. Este test permite evaluar si la recta obtenida pasa por el origen de coordenadas, determinando si la ordenada en el origen es significativamente distinta de cero. Habitualmente, suele aceptarse que el valor de dicha ordenada sea como máximo el que corresponde a un 1% de la respuesta del analito a valor nominal.

Se ha comprobado matemáticamente que un criterio del 1% para el test de proporcionalidad equivale a un 9% para el incremento de factores de respuesta (Figura 3.11. y Ecuación 3.2). Finalmente, se ha establecido un criterio de aceptación para $\Delta FR\%$ del test PQ de 5%, que supone un criterio más restrictivo.

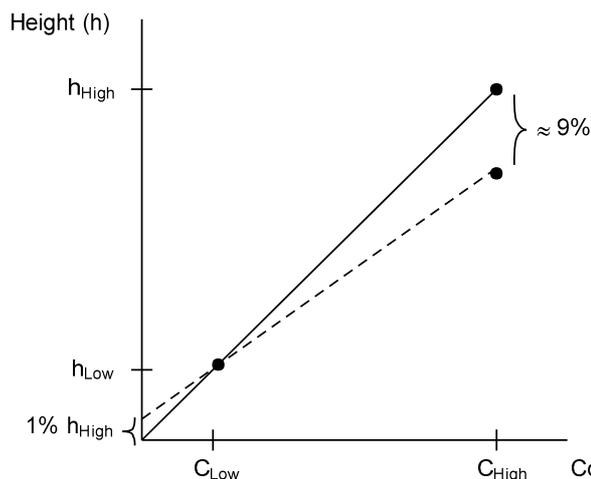


Figura 3.11. Relación entre el test de proporcionalidad y los factores de respuesta.

c) Carryover

El *carryover* se calcula mediante la relación de alturas de los picos de naftaleno y bifenilo en un blanco respecto a la altura de éstos en una disolución a alta concentración que se ha inyectado previamente ($h_{\text{Blanco}}/h_{\text{Alta}}\%$).

3.4.4- Secuencia PQ

La secuencia de inyección del test PQ, que se presenta en la Tabla 3.28, consiste en dos inyecciones de blancos (uno al inicio y otro al final), cinco inyecciones de la mezcla de sustancias a baja concentración (D_{Baja}) y dos inyecciones de la misma mezcla diez veces más concentrado (D_{Alta}).

Muestra	Inyecciones
Blanco	1
D_{Baja}	5
D_{Alta}	2
Blanco	1

Tabla 3.28. Secuencia de inyección del test PQ.

3.4.5- Resultados del test PQ

Tal y como se había comentado anteriormente, para calcular los parámetros del test PQ relacionados con los tiempos de retención ($\Delta t_r\%$ y $\Delta k_{\text{Trifenilamina}}$), es necesario establecer los valores de referencia de los tiempos de retención del cromato, naftaleno, bifenilo y trifenilamina y el valor de referencia del factor de retención de la trifenilamina.

Estos valores de referencia se obtienen realizando una vez el test con tres columnas reservadas para el test PQ y calculando los valores promedio de t_r y $k_{\text{Trifenilamina}}$. Al continuar el trabajo con una de estas columnas, se utilizarán estos valores de referencia iniciales. A partir del cuarto test, se procederá a recalcular estos valores: se utilizará como referencia el promedio de los resultados de los tiempos de retención y factor de retención de los tres test PQ anteriores. De esta manera, se consigue mantener un seguimiento de la columna y eliminar la influencia del deterioro natural de ésta.

La Tabla 3.29 presenta los resultados de t_r y $k_{\text{Trifenilamina}}$ al aplicar el test en las tres columnas reservadas para el test PQ (C1, C2 y C3) y los valores promedio o valores de referencia de tiempos de retención y factor de retención.

	t_r Cromato (min)	t_r Naftaleno (min)	t_r Bifenilo (min)	t_r Trifenilamina (min)	$k_{\text{Trifenilamina}}$
Columna 1	0,653	3,128	3,862	8,471	11,98
Columna 2	0,641	3,148	3,894	8,603	12,41
Columna 3	0,640	3,201	3,962	8,771	12,71
Valor referencia	0,645	3,159	3,906	8,615	12,36

Tabla 3.29. Valores de referencia iniciales para el test PQ.

A continuación, en las Tablas 3.30 y 3.31, se presentan los resultados de aplicar el test en la columna 2 (C2): tiempo de retención (t_r), valores de referencia de t_r (Ref. t_r), variación del tiempo de retención (Δt_r), factor de retención ($k_{\text{Trifenilamina}}$), valores de referencia de $k_{\text{Trifenilamina}}$ (Ref. $k_{\text{Trifenilamina}}$) y variación del factor de retención ($\Delta k_{\text{Trifenilamina}}$).

Test PQ (C2)	Cromato			Naftaleno		
	t_r (min)	Ref. t_r (min)	Δt_r %	t_r (min)	Ref. t_r (min)	Δt_r %
1	0,641	0,645	-0,6	3,148	3,159	-0,3
2	0,648	0,645	0,4	3,139	3,159	-0,6
3	0,651	0,645	1,0	3,139	3,159	-0,6
4	0,652	0,647	0,8	3,137	3,142	-0,2
5	0,657	0,650	1,1	3,128	3,138	-0,3
6	0,653	0,654	0,0	3,114	3,135	-0,7
7	0,661	0,654	1,0	3,127	3,126	0,0
8	0,654	0,657	-0,5	3,094	3,123	-0,9
9	0,658	0,656	0,3	3,083	3,112	-0,9
10	0,657	0,657	-0,1	3,109	3,102	0,2
11	0,657	0,656	0,1	3,115	3,095	0,7
12	0,660	0,657	0,5	3,096	3,103	-0,2

Test PQ (C2)	Bifenilo			Trifenilamina		
	t_r (min)	Ref. t_r (min)	Δt_r %	t_r (min)	Ref. t_r (min)	Δt_r %
1	3,894	3,906	-0,3	8,603	8,615	-0,1
2	3,876	3,906	-0,8	8,526	8,615	-1,0
3	3,879	3,906	-0,7	8,541	8,615	-0,9
4	3,876	3,883	-0,2	8,546	8,556	-0,1
5	3,861	3,877	-0,4	8,474	8,538	-0,7
6	3,843	3,872	-0,7	8,412	8,520	-1,3
7	3,860	3,860	0,0	8,471	8,477	-0,1
8	3,817	3,855	-1,0	8,353	8,452	-1,2
9	3,795	3,840	-1,2	8,251	8,412	-1,9
10	3,835	3,824	0,3	8,392	8,358	0,4
11	3,848	3,816	0,9	8,447	8,332	1,4
12	3,817	3,826	-0,2	8,331	8,363	-0,4

Tabla 3.30. Resultados PQ (t_r , Ref. t_r y Δt_r del cromato, naftaleno y bifenilo).

Test PQ (C2)	$k_{\text{Trifenilamina}}$	Ref. $k_{\text{Trifenilamina}}$	$\Delta k_{\text{Trifenilamina}}$
1	12,41	12,36	0,05
2	12,17	12,36	0,19
3	12,11	12,36	0,25
4	12,11	12,25	0,14
5	11,89	12,13	0,24
6	11,88	12,03	0,15
7	11,82	11,96	0,14
8	11,78	11,86	0,08
9	11,54	11,83	0,29
10	11,59	11,86	0,27
11	11,86	11,64	0,21
12	11,62	11,66	0,04

Tabla 3.31. Resultados PQ (t_r , Ref. t_r , Δt_r , k , Ref. k y Δk de la trifenilamina).

Los resultados de CV% de la altura de los picos de naftaleno y bifenilo obtenidos al llevar a cabo el test PQ en la columna 2 (C2) se muestran en la Tabla 3.32.

Test PQ (C2)	CV% Naftaleno	CV% Bifenilo
1	0,16	0,20
2	0,15	0,17
3	0,18	0,13
4	0,093	0,10
5	0,24	0,31
6	0,11	0,10
7	0,11	0,13
8	0,051	0,074
9	0,11	0,092
10	0,090	0,17
11	0,34	0,42
12	0,058	0,077

Tabla 3.32. Resultados PQ (Repetibilidad de inyección).

La Tabla 3.33 presenta los valores de las concentraciones de los patrones de bifenilo (C_{Baja} y C_{Alta}), las alturas (h_{Baja} y h_{Alta}), los factores de respuesta (FR_{Baja} y FR_{Alta}) y los resultados de $\Delta FR\%$ obtenidos al aplicar el test PQ seis veces con la columna 1 (C1).

PQ test (C1)	C_{Baja} (mg/L)	C_{Alta} (mg/L)	h_{Baja} (mAU)	h_{Alta} (mAU)	FR_{Baja} ((mg/L)/mAU)	FR_{Alta} ((mg/L)/mAU)	$\Delta FR\%$
1	8,0	80	153	1482	0,052	0,054	3,3
2	8,2	82	157	1530	0,052	0,054	2,7
3	8,2	82	158	1531	0,052	0,054	3,2
4	8,2	82	158	1529	0,052	0,054	3,3
5	8,1	81	160	1562	0,051	0,052	2,5
6	8,1	81	160	1559	0,051	0,052	2,9

Tabla 3.33. Resultados PQ (Linealidad del detector).

La Tabla 3.34 presenta un ejemplo de cálculo del parámetro $h_{Blanco}/h_{Alta}\%$ que se utiliza para obtener el resultado de *carryover*.

	Naftaleno	Bifenilo
h_{Blanco} (mAU)	0,08	0,32
h_{Alta} (mAU)	945	1564
$h_{Blanco}/h_{Alta}\%$	0,01	0,02

Tabla 3.34. Resultados del test PQ (*Carryover*).

El cromatograma del blanco se amplía en el eje de las ordenadas, estudiando si aparecen señales de naftaleno y bifenilo de las inyecciones previas (Figura 3.12).

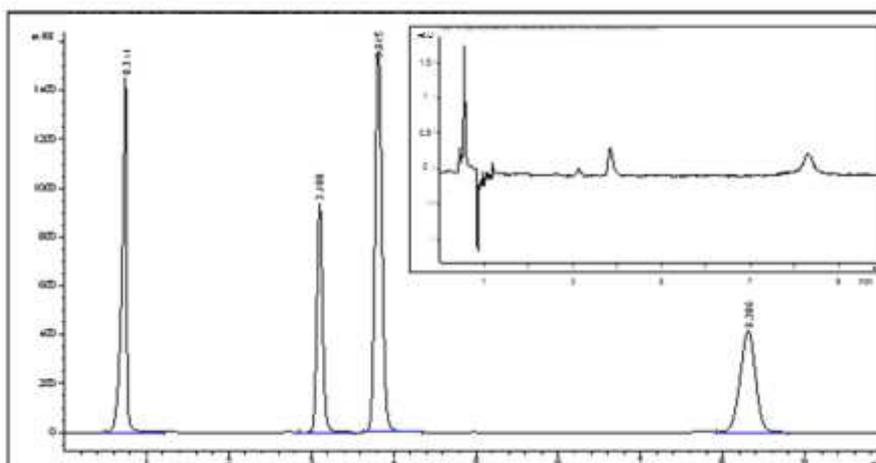


Figura 3.12. Cromatogramas para el estudio del *carryover* (mAU vs min).

3.4.6- Discusión de resultados

El test PQ diseñado permite evaluar el buen funcionamiento del equipo desde un punto de vista global, ya que el planteamiento realizado es del tipo “caja negra”. Sin embargo, si al aplicar el test se detecta algún resultado anómalo, el test PQ diseñado permite determinar qué parte del equipo está causando el problema. Los parámetros calculados con los tiempos de retención ($\Delta t_r\%$ y $\Delta k_{\text{Trifenilamina}}$) dan información de la bomba y del horno, mientras que los parámetros calculados con las alturas ($CV\%$, $\Delta FR\%$ and $h_{\text{Blanco}}/h_{\text{Alta}}\%$) dan información sobre el inyector y el detector.

Los criterios de aceptación para el test PQ establecidos en coherencia con el test OQ y según el estudio de verificación anteriormente detallado se presentan en la Tabla 3.35.

Parámetro	Descripción	Criterio de aceptación
$\Delta t_r\%$	Variación del tiempo de retención del cromato, naftaleno, bifenilo y trifenilamina respecto al valor de referencia	$\leq 2\%$
$\Delta k_{\text{Trifenilamina}}$	Variación del factor de retención de la trifenilamina respecto al valor de referencia	$\leq 0,5$
$CV\%$	Coeficiente de variación de las alturas del naftaleno y del bifenilo	$\leq 0,5\%$
$\Delta FR\%$	Variación del factor de respuesta del bifenilo a alta concentración respecto a baja concentración	$\leq 5\%$
$h_{\text{Blanco}}/h_{\text{Alta}}\%$	Altura del naftaleno y el bifenilo en una blanco respecto a las alturas en una disolución de concentración alta inyectada previamente	$\leq 0,2\%$

Tabla 3.35. Criterio de aceptación para el test PQ.

Los resultados obtenidos para los cinco parámetros del test PQ satisfacen claramente los criterios de aceptación establecidos. Cuando un resultado del test PQ no cumpla con los criterios de aceptación, se deberán tomar las medidas adecuadas para corregir los problemas detectados.

Por ejemplo, si el valor de $\Delta t_r\%$ para el naftaleno y el bifenilo fuera superior al 2%, no cumpliría con el criterio de aceptación. La evaluación de $\Delta t_{rCromato}\%$ y $\Delta k_{Trifenilamina}$ permitiría identificar si flujo, temperatura o composición de fase móvil han modificado su valor habitual de trabajo: $\Delta t_{rCromato}\%$ determina si el flujo ha cambiado y $\Delta k_{Trifenilamina}$ identifica un cambio en temperatura o en la composición (Ver Tabla 3.36).

	Flujo	Temperatura	Composición de la FM
$\Delta t_{rCromato}\%$	Varía en el mismo orden que las otras sustancias	Permanece prácticamente inalterado	Permanece prácticamente inalterado
$\Delta k_{Trifenilamina}$	Permanece inalterado ($\Delta k \leq 0,2$)	$\leq 0,5$ cada 2 K	$\geq 0,5$ con la variación de 1% de composición de FM

Tabla 3.36. Detección de problemas con el test PQ.

Cabe destacar que el test diseñado requiere el uso de una columna exclusiva. No obstante, el cálculo continuo de los valores de referencia de los tiempos de retención y del factor de retención permitirá eliminar el efecto del deterioro de la columna. De esta manera, se garantiza que los resultados anómalos se deben únicamente al equipo.

La cualificación PQ debe comprobar el buen funcionamiento del equipo en condiciones similares a las de trabajo. Por su versatilidad, el test PQ diseñado es especialmente interesante para la cualificación de cromatógrafos HPLC en laboratorios de análisis no rutinarios.

4. VALIDACIÓN DE PROCEDIMIENTOS DE ANÁLISIS Y ESTIMACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE DE LAS MEDIDAS

4.1. INTRODUCCIÓN

En la presente tesis se pretende demostrar que el método de cálculo de la incertidumbre a partir de los resultados de validación, desarrollado en anteriores trabajos del grupo de investigación, contempla todas las fuentes de error posibles, y que por tanto es compatible con el modelo de cálculo *bottom-up* descrito en la bibliografía (modelo de cálculo riguroso). Además, la facilidad de los cálculos se pondrá de manifiesto al aplicarlo a:

- Un procedimiento para el análisis de cloruros por HPLC en muestras de lixiviado.
- Un procedimiento para el análisis de ácido palmítico y esteárico por GC en muestras de estearato de magnesio.

Por otra parte, se plantea la optimización y revalidación del procedimiento de análisis de nitrógeno Kjeldahl en muestras de taurina aplicando la información disponible a partir de las actividades de confirmación metrológica y en particular de los valores de incertidumbre de calibración.

4.2. MATERIAL

4.2.1. Equipos

a) Equipos para el análisis de nitrógeno *Kjeldahl*

Los equipos utilizados para el análisis de nitrógeno han sido: una balanza analítica Mettler AE200 (resolución= 0,1 mg; tolerancia= $\pm 0,5$ mg), un bloque digestor *JPSelecta* (Figura 4.1) y un destilador automático *microKjeldahl PN 1430 JPSelecta*.

Después de llevar a cabo la digestión, cada uno de los tubos se va introduciendo individualmente en el destilador automático. Dicho equipo dosifica la cantidad deseada de reactivos para el análisis, realiza la destilación de la muestra proveniente de la etapa de digestión y lleva a cabo una valoración "on line" del destilado, detectando el punto final automáticamente por un cambio de color (Figura 4.2).



Figura 4.1. Bloque digestor JPSelecta.

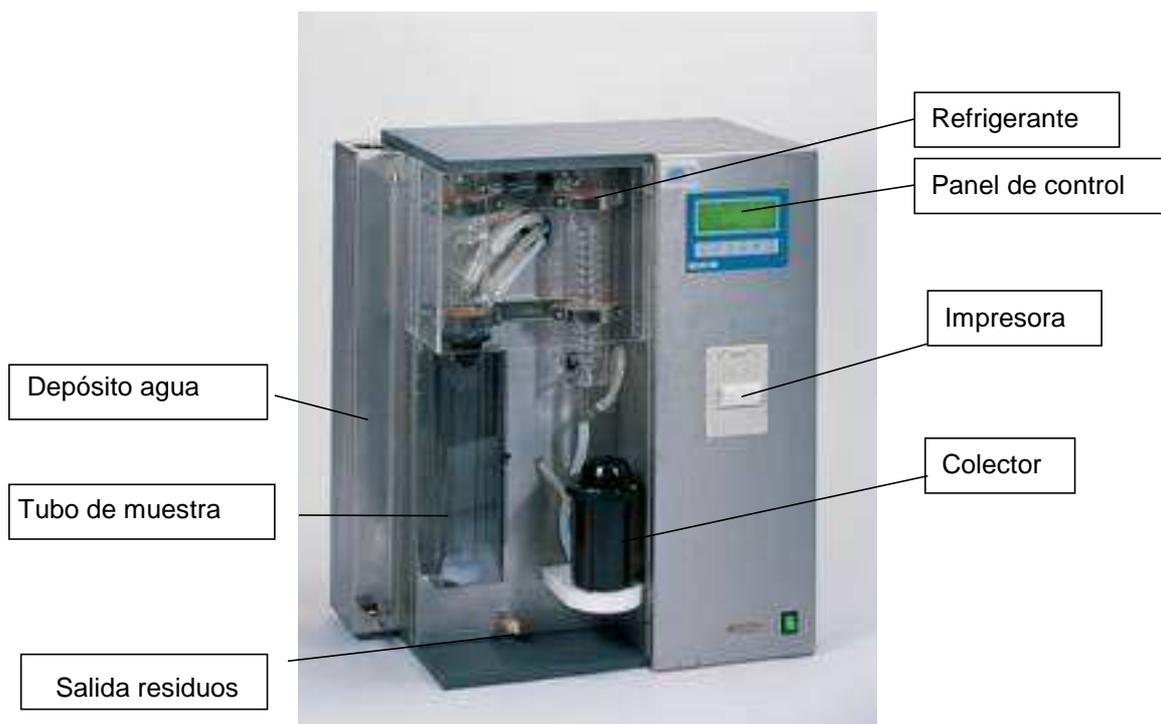


Figura 4.2. Destilador automático microKjeldahl PN 1430 JPSelecta.

b) Equipos para el análisis de cloruros por HPLC

Los equipos utilizados han sido un cromatógrafo de líquidos Waters ILC-1 y una balanza Mettler Toledo AB204 (resolución= 0,1 mg; tolerancia= $\pm 0,5$ mg).

Las condiciones cromatográficas se detallan en la Tabla 4.1.

Condiciones cromatográficas HPLC			
Inyector	Tipo	Waters 717	
	Volumen de inyección	100 μ L	
Columna	Tipo	IC-Pak Anion 10 μ m, 4,6 x 50 mm	
	Flujo	1,2 mL/min	
	Fase móvil	86% agua Milli-Q	
		12% ACN 2% tampón borato - gluconato	
Detector	Tipo	Waters 430	
	Temperatura	ON	

Tabla 4.1. Condiciones cromatográficas para la determinación de cloruros por HPLC.

El cromatógrafo de líquidos Waters ILC-1 utilizado se muestra en la Figura 4.3:



Figura 4.3. Cromatógrafo de líquidos Waters ILC-1.

c) Equipos para el análisis de ácido palmítico y ácido esteárico por GC

Los equipos utilizados han sido un cromatógrafo de gases HP 6890 Series GC System con un inyector splitter/splitless y un detector de ionización de llama (FID) y una balanza Mettler Toledo AB204 (resolución= 0,1 mg; tolerancia= \pm 0,5 mg).

En la Tabla 4.2 se presentan las condiciones cromatográficas utilizadas. Cabe destacar que la separación se realiza con una fase estacionaria 90% biscianopropil-10% cianopropilfenil silicona en lugar de utilizar la fase macrogol 20000 propuesta en la Farmacopea Europea. Ambas fases de alta polaridad son excelentes para separar los ésteres metílicos de los ácidos grasos habituales.

Condiciones cromatográficas HRGC			
Inyector	Volumen de inyección	1 µL	
	Gas portador	Helio	
	Inyección tipo	Splitter	
	Flujo Spliter	20 mL/min	
	Relación splitter	1:25	
	Temperatura	250 °C	
Columna	Tipo	Capilar Supelco SP 2380	
	Dimensiones	60 m X 250 µm X 0,20 µm	
	Flujo	0,8 mL/min (P ~ 24 psi)	
Horno	Tiempo (min)	Temperatura (°C)	Rampa (°C/min)
	0-1	150	-
	1-28,5	150-260	4
	28,5-38,5	260	-
Detector FID	Aire	450 mL/min	
	Hidrógeno	40 mL/min	
	Gas auxiliar (N ₂)	20 mL/min	
	Temperatura	250 °C	

Tabla 4.2. Condiciones cromatográficas para la determinación de ácidos grasos por HRGC-FID.

El cromatógrafo de gases HP 6890 Series GC System utilizado se muestra en la Figura 4.4:



Figura 4.4. Cromatógrafo de gases HP 6890 Series GC System con FID.

4.2.2. Reactivos y patrones

a) Reactivos y patrones para el análisis de nitrógeno Kjeldahl

Los patrones utilizados han sido ácido sulfúrico 0,1N y 0,5N de Panreac para valoración, sulfato de amonio 99% de Panreac para la cualificación del equipo y un material de referencia de taurina facilitado por un laboratorio farmacéutico. Aunque la normalidad es una nomenclatura en desuso, en este capítulo se ha trabajado con ella para mantener la coherencia con el estudio previo de confirmación metrológica que realizó el grupo [Monràs et al. 2003] y debido a que la USP actualmente sigue utilizando este término [USP 30-NF 25 (a), 2007].

Los reactivos utilizados para la mineralización son ácido sulfúrico al 96% (p/p) de Scharlau y $K_2SO_4/CuSO_4$ en tabletas de Merck como catalizador. En la destilación se han utilizado hidróxido de sodio en perlas y ácido bórico 99,5% de Panreac. El hidróxido de boro y el ácido bórico se diluyen al 40% (p/v) y al 4% (p/v) respectivamente.

b) Reactivos y patrones para el análisis de cloruros por HPLC

El análisis se ha realizado con un patrón de Cl^- , NO_3^- , SO_4^{2-} , de 1000 mg/L de Merck.

Los reactivos han sido, gluconato de sodio de Merck, ácido bórico de Riedel-de-Haën, tetraborato de sodio decahidratado cristalizado de Riedel-de-Haën, glicerina de Panrec, acetonitrilo de calidad HPLC gradiente de Merck y agua Milli-Q.

Se preparan las disoluciones de trabajo de 5, 10, 20 y 50 mg/L de cloruro a partir de la disolución patrón de 1000 mg/L. El blanco que se utiliza es agua Milli-Q.

Los volúmenes de disolución patrón concentrado (1000 mg/L) que deben tomarse para preparar estas disoluciones de trabajo son:

- P 5 mg/L: En un aforado de 1000 mL se transfieren 5 mL del patrón concentrado y se enrasa con agua Milli-Q.
- P 10 mg/L: En un aforado de 500 mL se transfieren 5 mL del patrón concentrado y se enrasa con agua Milli-Q.
- P 20 mg/L: En un aforado de 500 mL se transfieren 10 mL del patrón concentrado y se enrasa con agua Milli-Q.
- P 50 mg/L: En un aforado de 100 mL se transfieren 5 mL del patrón concentrado y se enrasa con agua Milli-Q.

Por otro lado, se prepara un tampón borato-gluconato que se utiliza como componente de la fase móvil: 16,0 g de gluconato de sodio, 18,0 g de ácido bórico, 25,0 g de tetraborato de sodio y 250 mL de glicerina, y enrasando hasta 1 L con agua Milli-Q [Eaton et al. 1998].

La fase móvil de trabajo se prepara tomando 20 mL de la disolución del tampón borato-gluconato y e introduciéndolos en un matraz aforado de 1 L. Posteriormente, se añade 120 mL de acetonitrilo y se enrasa hasta 1 L con agua Milli-Q. Finalmente, se filtra la disolución en con un filtro de membrana de nylon de 0,22 μm y se desgasifica con corriente de Helio durante 10 minutos.

c) Reactivos y patrones para el análisis de ácido palmítico y ácido esteárico por GC

Los patrones utilizados han sido ácido palmítico de riqueza 99% de Sigma-Aldrich, ácido esteárico 99,5% de Sigma-Aldrich, palmitato de metilo 97% de Fluka, estearato de metilo 99% de Sigma-Aldrich, laureato de metilo 99,5% de Sigma-Aldrich, miristato de metilo 99% de Sigma-Aldrich, oleato de metilo 99% de Sigma-Aldrich, araquidato de metilo 99% de Fluka.

Los reactivos utilizados durante el análisis y la validación son: trifloruro de boro en metanol 140 g/L ($\text{BF}_3/\text{CH}_3\text{OH}$) de Sigma-Aldrich, heptano de Fluka, cloruro de sodio de Panreac y sulfato de sodio anhidro de Panreac.

4.3. OPTIMIZACIÓN Y REVALIDACIÓN DEL PROCEDIMIENTO DE ANÁLISIS DE NITRÓGENO KJELDAHL EN MUESTRAS DE TAURINA

4.3.1. Análisis de taurina

La taurina es un ácido orgánico que interviene en la formación de la bilis, que se encuentra naturalmente en pequeñas cantidades en los tejidos de muchos seres vivos (incluyendo a los humanos) y por lo tanto en varios alimentos. Es un derivado del aminoácido cisteína que se obtiene por la descarboxilación y la oxidación del grupo tiol de ésta, y es el único ácido sulfónico natural conocido (Figura 4.5). Existe en la mayoría de los tejidos animales y es un nutriente esencial, muy importante en el crecimiento de los mamíferos [Brosnan, 2006; The Merck Index, 2006].

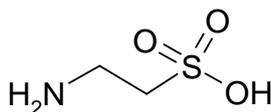


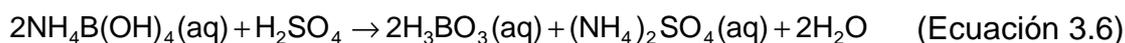
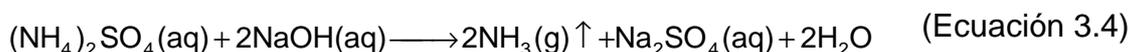
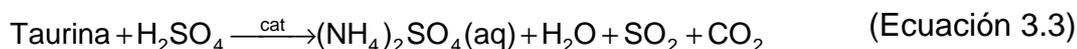
Figura 4.5. Fórmula de la taurina.

Durante varios años se han realizado investigaciones científicas sobre las posibles aplicaciones médicas de la taurina en terapias nutricionales, y algunas de ellas han proporcionado resultados positivos para el tratamiento de varias enfermedades comunes. En relación con su capacidad de acción para evitar la fatiga, se ha demostrado que la taurina mejora la fuerza del músculo del corazón y previene el desarrollo de cardiomiopatías (debilitamiento cardíaco que impide la adecuada distribución de la sangre) [Geiss, 1994; Ratamess, 2007]. Otros experimentos han ayudado a entender que esta sustancia tiene una acción protectora en la retina del ojo, evitando los efectos dañinos de la luz ultravioleta y de algunas sustancias tóxicas, responsables del deterioro visual [Gupta, 2005; Lima, 1999].

El análisis de nitrógeno mediante el método Kjeldahl se inicia con una etapa de mineralización de la muestra de taurina. La mineralización se realiza utilizando ácido sulfúrico al 96% y $K_2SO_4/CuSO_4$ en tabletas como catalizador. Se

calienta hasta unos 370 °C y se mantiene a esta temperatura durante unos 30 minutos.

De esta manera, el nitrógeno contenido en la muestra se convierte en catión amonio, mientras que el resto de materia orgánica se oxida a agua y dióxido de carbono. Una vez digerida la muestra, se basifica con NaOH al 40% (p/v). El amoníaco generado se destila por arrastre por vapor y se recoge en una disolución de H₃BO₃ al 4% (p/v). La disolución de borato de amonio obtenida se valora con una disolución patrón de H₂SO₄ (ver Ecuación 3.3 a Ecuación 3.6) [Monràs et al., 2003].



El volumen de ácido sulfúrico utilizado para valorar la disolución de borato de amonio permite calcular el porcentaje de nitrógeno (Nitrógeno en % p/p) presente en la muestra (Ecuación 3.7):

$$\text{Nitrógeno \% (p/p)} = V(\text{mL H}_2\text{SO}_4) \frac{1\text{L}}{1000\text{mL}} N(\text{eqH}_2\text{SO}_4/\text{L}) \frac{1\text{eqNH}_4\text{B}(\text{OH})_4}{1\text{eqH}_2\text{SO}_4} \frac{14,01\text{gN}}{1\text{eqNH}_4\text{B}(\text{OH})_4} \frac{1}{P(\text{g})} 100 \quad (\text{Ecuación. 3.7})$$

Siendo:

V (mL H₂SO₄): volumen en mL de ácido sulfúrico necesarios para valorar la disolución de borato de amonio.

N (eq H₂SO₄/L): concentración del ácido sulfúrico en unidades de normalidad.

P (g): peso en gramos de muestra.

En el presente trabajo, se ha optimizado el procedimiento de análisis de nitrógeno *Kjeldahl* de la *U.S. Pharmacopeia* [USP 30-NF 25 (a) 2007], para su aplicación en la determinación de la pureza de muestras de taurina. Para ello, se ha tenido en cuenta que, según especificaciones de la *USP*, dicha pureza deberá estar comprendida entre el 98,5 y el 101,5% [USP 30-NF 25 (b), 2007].

A estos valores, por estequiometría del compuesto, les corresponde un porcentaje en nitrógeno comprendido entre el 11,03 y 11,36% (p/p). Una vez optimizado el método de análisis, se ha procedido a su revalidación.

AEFI propone un modelo de cálculo que permite obtener el número de replicados (n) que se deben realizar en la aplicación de un procedimiento de análisis de materias primas y especialidades, a partir del coeficiente de variación de la repetibilidad del procedimiento (CV%) y el valor límite aceptado (LA, en %). En el caso de la determinación de la pureza, LA corresponde al valor máximo o mínimo de las especificaciones de la muestra (Ecuación 3.8).

$$CV\% = |100 - LA| \frac{\sqrt{n}}{2,58} \quad (\text{Ecuación 3.8})$$

El valor de 2,58 es el valor tabulado en una distribución t de Student correspondiente a un intervalo de confianza del 99% ($\alpha = 0,01$) y con el máximo número de grados de libertad (∞).

La Tabla 4.3 resume los valores del coeficiente de variación de la repetibilidad del procedimiento (CV%), mediante la aplicación de la Ecuación 3.8 para diferentes valores de LA y número de replicados (n).

LA	Nº de replicados (n)					
	1	2	3	4	5	6
99,0-101,0 %	0,4	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0
98,5-101,5 %	0,6	0,8	1,0	1,2	1,3	1,4
98,0-102,0 %	0,8	1,1	1,3	1,6	1,7	1,9
95,0-105,0 %	1,9	2,7	3,4	3,9	4,3	4,8
90,0-110,0 %	3,9	5,5	6,7	7,8	8,7	9,5
85,0-115,0 %	5,8	8,2	10,1	11,6	13,0	14,2

Tabla 4.3. Coeficiente de variación (CV%) en función del límite de aceptación (LA) y el nº de replicados (n) [AEFI, 2001].

En el presente trabajo, el número de replicados a realizar se establece utilizando el valor de LA establecido en la *USP* y el valor del CV% obtenido a partir de las actividades de cualificación del equipo.

Se dispone de un estudio previo de cualificación del destilador automático utilizando un patrón de sulfato de amonio. Se determina la incertidumbre de los resultados, según la cantidad de nitrógeno y la normalidad del ácido sulfúrico utilizado en la valoración (Tabla 4.4) [Monràs et al., 2003].

La incertidumbre del equipo (u_{equipo}) se ha obtenido a partir de la suma cuadrática de la contribución de la incertidumbre del patrón, la resolución del equipo, la precisión y la exactitud de los resultados obtenidos (Ecuación 3.9).

$$u_{\text{equipo}} = \sqrt{u_{\text{patrón}}^2 + u_{\text{resolución}}^2 + u_{\text{precisión}}^2 + u_{\text{exactitud}}^2} \quad (\text{Ecuación. 3.9})$$

mg Nitrógeno	H ₂ SO ₄ (normalidad)				
	0,02 N	0,05 N	0,10 N	0,25 N	0,50 N
0,5	3,1 %	-			
1	5,5 %	2,9 %			
2	4,3 %	2,2 %			
3	-	2,4 %			
4	4,7 %	2,1 %			
5	3,3 %	2,0 %	1,7 %		
6	2,7 %	-	-		
7	-	1,4 %	-		
8	4,2 %	-	-		
10		1,8 %	1,4 %	1,4 %	
13		1,4 %	-	-	
15		1,3 %	1,6 %	-	
20		1,5 %	1,4 %	1,4 %	4%
25			1,4 %	-	-
30			2,2 %	1,0 %	-
35			2,5 %	-	-
40			1,4 %	2,2 %	3,2 %
50				1,1 %	0,4 %
100				1,2 %	1,3 %
150					2,0 %
200					1,8 %

Tabla 4.4. Incertidumbre expandida del equipo ($U = 2 \cdot u_{\text{equipo}}$; $k=2$; $p=95\%$) según la concentración de ácido sulfúrico utilizado y la masa de nitrógeno analizada (mg Nitrógeno) [Monràs et al. 2003].

A la vista de los resultados obtenidos (Tabla 4.4), y teniendo en cuenta que la USP recomienda utilizar H₂SO₄ 0,1 N cuando se analizan más de 2 o 3 mg de nitrógeno se ha decidido realizar el análisis de taurina con una cantidad de muestra equivalente a 10 mg de nitrógeno, es decir, con 0,1 g de muestra. En tal caso, el error asociado al sistema instrumental se considera adecuado ($U = \pm 1,4\%$) ya que permitiría controlar el producto dentro del intervalo de aceptación establecido en las especificaciones ($100-LA = 100-98,5 = 1,5\%$). Cabe destacar que en estas condiciones, y realizando replicados independientes, la contribución del error de la pesada ($\pm 0,5\%$) queda incluida en el término de la precisión.

Por otra parte, al considerar que el valor máximo permitido para el coeficiente de variación de repetibilidad (CV%) es de 1,4% y aplicar el modelo propuesto por AEFI para un valor de LA de 98,5%, se obtiene que el número de replicados a realizar es 6 (Tabla 4.3).

4.3.2. Método inicial

Para realizar los análisis se dispone de un material de referencia de taurina facilitado por laboratorio farmacéutico, que cumple las especificaciones de la USP.

El análisis del porcentaje en nitrógeno (nitrógeno en % p/p), se realiza por pesada de 0,1 g de taurina (resolución = 0,1 mg) y valorando con H₂SO₄ 0,1 N. Los resultados obtenidos para los seis replicados se presentan en la Tabla 4.5.

Replicados	Peso (g)	Volumen H ₂ SO ₄ (mL)	Nitrógeno (mg)	Nitrógeno (% p/p)
1	0,1089	8,27	11,58	10,64
2	0,1051	8,25	11,56	10,61
3	0,1071	8,51	11,92	10,95
4	0,1094	8,25	11,56	10,61
5	0,0168	8,49	11,89	10,92
6	0,1089	8,26	11,57	10,62
Promedio				10,72
Desviación estándar				0,16
CV (%)				1,5

Tabla 4.5. Análisis de una muestra de taurina (0,1 g) con H₂SO₄ 0,1 N.

Como se observa, la precisión de los resultados es del mismo orden de magnitud que el criterio de aceptación establecido (1,4%), pero el promedio de los resultados obtenidos (10,72% de nitrógeno) es inferior al esperado y se encuentra fuera de especificaciones (11,03-11,36% de nitrógeno).

4.3.3. Optimización del método

Se supone que el resultado fuera de especificaciones lo produce el peso de muestra, ya que según el procedimiento utilizado, en el que el peso de muestra es de 0,1 g, un error de 0,002 g ($\pm 2\%$) provocaría que los resultados estuvieran fuera de especificaciones (11,03-11,36% de nitrógeno). En consecuencia, teniendo en cuenta la incertidumbre de la balanza ($\pm 0,5$ mg) se considera necesario aumentar el peso de muestra.

Se decide pesar 0,5 g de muestra, que equivalen a unos 50 mg de nitrógeno, y utilizar ácido sulfúrico 0,5 N. Además, en estas condiciones de trabajo, como se observa en la Tabla 4.4, la aportación de incertidumbre del equipo se reduce notablemente.

Los replicados del análisis del porcentaje en nitrógeno realizados con 0,5 g de muestra de taurina, utilizando H_2SO_4 0,5 N proporcionan los siguientes resultados (Tabla 4.6).

Replicados	Peso (g)	Volumen H_2SO_4 (mL)	Nitrógeno (mg)	Nitrógeno (% p/p)
1	0,5072	7,80	54,72	10,94
2	0,5052	7,86	55,15	11,03
3	0,5396	7,91	55,51	11,10
4	0,5127	7,89	55,36	11,07
5	0,5022	7,93	55,62	11,12
6	0,5043	7,98	56,01	11,20
Promedio				11,08
Desviación estándar				0,09
CV (%)				0,8

Tabla 4.6. Análisis de una muestra de taurina (0,5 g) con H_2SO_4 0,5 N.

En este caso el valor promedio obtenido para el porcentaje de nitrógeno es de 11,08%. Se considera correcto el análisis ya que este valor se encuentra dentro de las especificaciones requeridas (11,03 - 11,36% de nitrógeno) y sólo uno de los resultados no cumple con dichas especificaciones [USP 30-NF 25 (b),

2007]. Además el coeficiente de variación obtenido ($CV\% = 0,8$) cumple con el criterio de aceptación establecido (1,4%).

4.3.4. Revalidación

Una vez establecidas las condiciones óptimas de trabajo y redactado el procedimiento normalizado de trabajo (PNT), es necesario realizar la revalidación del mismo ya que se han realizado modificaciones respecto al método de análisis descrito en la *USP* [*USP* 40-NF 25 (a), 2007]. Los cambios de condiciones operacionales realizados se resumen en la Tabla 4.7.

	USP	PNT
Peso muestra (g)	0,03	0,5
mg Nitrógeno	3	50
Catalizador	$K_2SO_4/CuSO_4$	$K_2SO_4/CuSO_4$
conc. H_2SO_4 (N)	0,1	0,5

Tabla 4.7. Resumen condiciones de trabajo: según *USP* y PNT.

Para el estudio de revalidación será necesario estimar la selectividad y la precisión del método (Tabla 1.9). No es necesario hacer un estudio del límite de cuantificación, ya que no se trabaja con una cantidad crítica de analito.

Para demostrar la selectividad del método, se estudia la exactitud mediante el cálculo de la recuperación de la muestra de taurina (material de referencia interno) y garantizando así la ausencia de interferencias (Tabla 4.8).

Nº de replicados	Peso (g)	Recuperación (%)
1	0,5072	97,8
2	0,5052	98,6
3	0,5396	99,2
4	0,5127	98,9
5	0,5022	99,4
6	0,5043	100,1
	Promedio	99,0

Tabla 4.8. Estudio de la recuperación en una muestra de taurina.

El valor promedio obtenido para la recuperación es del 99,0%, valor que cumple con las especificaciones de la farmacopea.

Para el estudio de la precisión del método, se dispone de los resultados presentados en la Tabla 4.6 que se consideran adecuados (CV% = 0,8).

Tal y como se ha detallado anteriormente, los valores de CV% y LA determinan el número de replicados a realizar. Considerando el valor de CV%= 0,8 en la Tabla 4.3, el número de replicados a realizar sería de 2. Sin embargo, se decide considerar que los valores obtenidos para la precisión (CV%= 0,8) y la exactitud (recuperación% = 99,0 o sesgo% = 1,0) son las principales contribuciones para la estimación de la incertidumbre de los resultados. Por ello, se realiza la suma cuadrática y se obtiene un valor de incertidumbre de 1,3%. Utilizando este valor como criterio en la Tabla 4.3 el número de replicados a realizar sería de 5. Este valor se considera más adecuado.

En la Tabla 4.9 se resumen las condiciones de trabajo y los resultados obtenidos para el análisis de taurina correspondiente al método inicial y al método optimizado.

	Método inicial	Método optimizado
Peso muestra (g)	0,1	0,5
conc. H ₂ SO ₄ (N)	0,1	0,5
Nº de análisis	6	5
Promedio resultados (% Nitrógeno)	10,72%	11,08%
CV (%)	1,5	0,8

Tabla 4.9. Resultados del análisis de taurina: según método inicial y optimizado.

A la vista de los resultados anteriores, se puede concluir que el método optimizado es selectivo y preciso y por tanto, se considera revalidado.

4.3.5. Discusión de resultados

El método optimizado para el análisis de nitrógeno *Kjeldahl*, utilizando el bloque digestor y el destilador automático PN 1430 JPSelecta, permite determinar la pureza de muestras de taurina según las especificaciones de la *USP*, tal como se ha comprobado con su revalidación.

El aumento de la cantidad de muestra ha permitido reducir la incertidumbre del método ya que el error de pesada tiene más influencia en caso de pesar 0,1 gramos que al pesar los 0,5 gramos. Por otro lado, al pasar de 0,1 a 0,5, según el estudio de cualificación, el equipo también trabaja en una zona de menor incertidumbre y por tanto la dispersión de los valores es aún menor.

Al tratarse de un cambio operacional, y tal como indica AEFI, para realizar la revalidación ha sido suficiente con estudiar la selectividad, precisión y límite de cuantificación del método. Con el objetivo de ahorrar tiempo y recursos, es conveniente escoger correctamente los parámetros que es necesario revalidar cuando se produce un cambio en el método.

La fórmula de AEFI para estimar el valor del mínimo número de replicados a realizar, conociendo el coeficiente de variación de la repetibilidad del método (CV%) y el límite de aceptación de las especificaciones, puede obtener resultados más representativos cuando se sustituye el término correspondiente a la repetibilidad (CV%) por el de la incertidumbre.

Las actividades de cualificación del equipo han permitido determinar las condiciones más adecuadas para realizar los ensayos (concentración de ácido y peso de muestra) teniendo en cuenta la precisión requerida por el método.

4.4. VALIDACIÓN DEL PROCEDIMIENTO DE ANÁLISIS DE CLORUROS POR HPLC EN MUESTRAS DE LIXIVIADO Y ESTIMACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE DE LOS RESULTADOS

4.4.1. Procedimiento de análisis

El análisis de cloruros en una muestra de lixiviados se realiza por cromatografía de líquidos con columna de intercambio iónico y detector de conductividad iónica sin columna supresora. La cuantificación se realiza con la técnica de patrón externo interpolando en una recta de calibrado calculada mediante la inyección de patrones de 5, 10, 20 y 50 mg/L de cloruros preparados al diluir un patrón certificado de 1000 mg/L de cloruros. El intervalo de concentraciones de cloruros en las muestras se encuentra comprendido entre 5 mg/L y 10000 mg/L [Báguena et al., 2008].

El análisis se realiza tomando tres alícuotas del lixiviado. Cada alícuota se filtra a través de un filtro de nylon de 0,45 µm de tamaño de poro y se recoge el filtrado en un vial de inyección. Cuando la concentración de la muestra supera los 50 mg/L se realizan las diluciones necesarias para que en la muestra se obtengan concentraciones comprendidas entre las 5 mg/L y de 50 mg/L de cloruros.

La secuencia de inyección recomendada es la siguiente:

- Ensayo de idoneidad.
- Inyección de muestras por duplicado.
- Inyección del blanco.
- Inyección de patrones por duplicado. (P 5, 10, 20 y 50 mg/L)

El ensayo de idoneidad comprueba la ausencia de picos interferentes mediante la inyección del blanco, del patrón y de la muestra. Además, se comprueba que el coeficiente de variación de los factores de respuesta obtenidos al inyectar por duplicado cada uno de los patrones no sea superior al 5 %.

Para obtener la concentración de la muestra, se calcula la recta de calibrado con las áreas de las dos inyecciones de cada patrón, mediante el método de los mínimos cuadrados, se interpola el valor del área de la muestra y se obtiene el valor de la concentración.

La concentración final de cloruros en la muestra se calcula multiplicando la concentración calculada en el apartado anterior por el inverso del factor de dilución efectuado en la muestra.

4.4.2. Validación

La validación se realiza mediante el estudio de selectividad, linealidad, exactitud, precisión, límites de detección y cuantificación.

a) Selectividad

La selectividad queda demostrada con el ensayo de idoneidad, comprobando la ausencia de picos interferentes al inyectar el blanco, la muestra y la muestra adicionada.

b) Linealidad

La linealidad se ha estudiado analizando patrones de cloruros a seis niveles de concentración: 5, 10, 20, 40, 50 y 80 mg/L. Cada uno de los patrones se ha preparado una vez y analizado por triplicado. Se ha calculado la media de las áreas correspondientes a cada nivel de concentración y representado la recta de área promedio frente a concentración (Figura 4.7) realizando el ajuste por mínimos cuadrados y obteniendo un coeficiente R^2 de 0,99992. Este valor cumple con el criterio de aceptación que se estableció de 0,990.

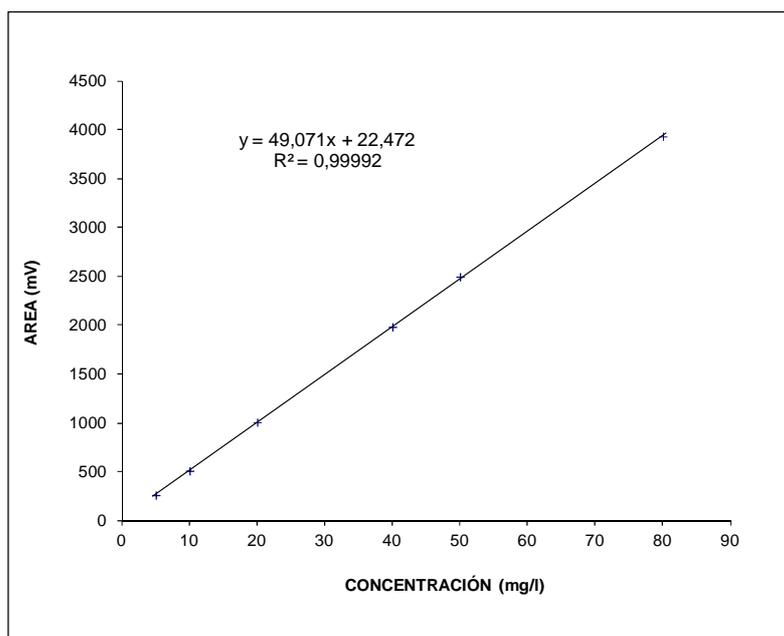


Figura 4.7. Recta de calibrado de cloruros.

En la Tabla 4.10 se presenta, para cada concentración de patrón (en mg/L), el área promedio (A en mV*s), la repetibilidad de las áreas (CV%) los factores de respuesta (FR en mg/(L*mV*s)) y el error residual (Residual%). Además, se presenta el coeficiente de variación de los factores de respuesta, que como se expuso en el apartado 1.4.2 se espera que no supere el 2%. En este caso el valor cumple exactamente con este criterio.

Concentración (mg/L)	A (mV*s)	CV(%)	FR (mg/(L*mV*s))	Residual (%)
5	261	0,38	0,0192	2,6
	262			
	260			
10	508	0,10	0,0197	0,81
	509			
	509			
20	1007	0,21	0,0199	0,38
	1006			
	1010			
40	1983	0,20	0,0202	0,12
	1987			
	1979			
50	2505	0,28	0,0200	0,90
	2499			
	2491			
80	3934	0,029	0,0203	0,32
	3936			
	3936			
F _R Promedio:			0,0199	
CV FR%:			2,0	

Tabla 4.10. Estudio de linealidad.

c) Exactitud y precisión

Para el estudio de exactitud y precisión se preparan muestras adicionadas a tres niveles de concentración: 50, 500 y 6000 mg/L de cloruros.

Se parte de las muestras M1 y M2, para las que en el análisis previo se han obtenido los siguientes resultados:

M1: cloruros: aprox. 1000 mg/L

M2: cloruros: aprox. 35 mg/L

Las muestras M1 y M2 se adicionan para conseguir los tres niveles de concentración:

Cloruros: aprox. 50 mg/L (M2 inicial: 35 + adición 15)

Cloruros: aprox. 535 mg/L (M2 inicial: 35 + adición 500)

Cloruros: aprox. 6000 mg/L (M1 inicial: 1000 + adición 5000)

A modo de ejemplo, en la Figura 4.8 se presenta la superposición de los cromatogramas correspondientes a la muestra original M2 (en negro) y a la muestra adicionada con 50 mg/L de cloruros (en azul).

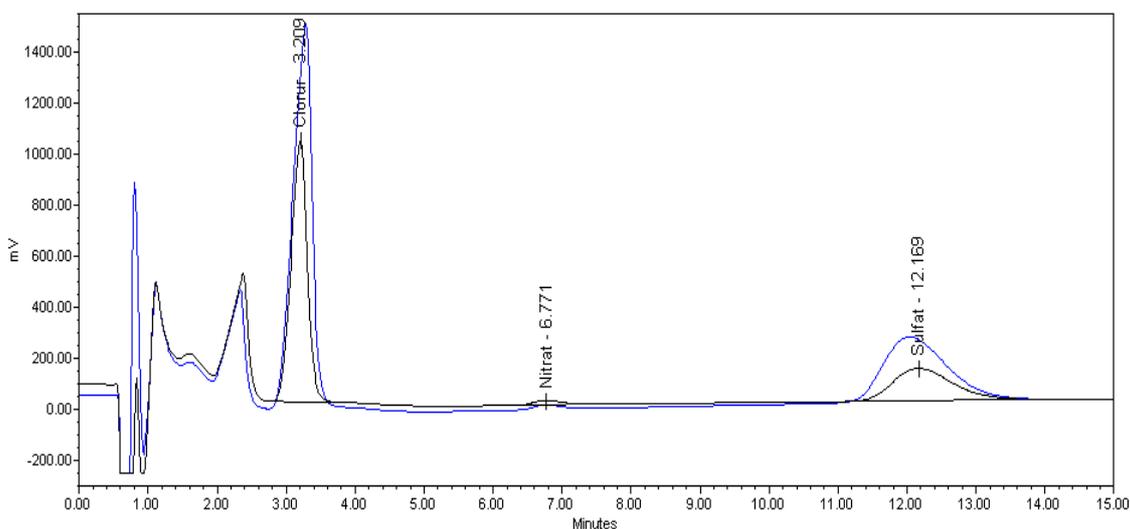


Figura 4.8. Cromatogramas de la muestra (negro) y muestra adicionada con 50 mg/L de cloruros (azul).

Para cada nivel de concentración se dispone de nueve determinaciones correspondientes a las tres preparaciones realizadas en tres días distintos (3 niveles x 3 días x 3 preparaciones).

La recuperación se calcula a partir de las 9 determinaciones realizadas para cada nivel de concentración, teniendo en cuenta la concentración presente en la muestra y en la muestra adicionada. Como criterio de aceptación para la recuperación en esta validación se estableció 80-120%.

La repetibilidad para cada nivel de concentración se calcula como la media de los tres coeficientes de variación de los tres resultados de cada día. Por otro lado, la precisión intermedia se calcula tomando el conjunto de las 9 determinaciones para el cálculo del coeficiente de variación. Como criterio de aceptación se estableció un CV% del 15% como máximo valor aceptable.

En la Tabla 4.11 se presentan los resultados obtenidos de Recuperación (%), Repetibilidad (CV%) y Precisión intermedia (CV%) para cada nivel de concentración.

Concentración Baja 50 mg/L	Concentración(mg/L) PRIMER DIA	Concentración(mg/L) SEGUNDO DIA	Concentración(mg/L) TERCER DIA
	57,9	57,6	57,8
	57,9	57,9	58,0
	58,1	57,8	57,6
Promedio	58,0	57,7	57,8
Desviación estandar	0,093	0,149	0,187
CV%	0,16	0,26	0,32
	Promedio	57,8	
	Precisión intermedia(CV%)	0,29	
	Repetibilidad (CV%)	0,26	
	Recuperación(%)	98,29	
Concentración Media 500 mg/L	Concentración(mg/L) PRIMER DIA	Concentración(mg/L) SEGUNDO DIA	Concentración(mg/L) TERCER DIA
	535,6	549,4	549,3
	553,5	549,0	557,2
	553,3	561,2	556,0
Promedio	547,5	553,2	554,2
Desviación estandar	10,3	6,9	4,2
CV%	1,9	1,2	0,8
	Promedio	551,6	
	Precisión intermedia(CV%)	1,3	
	Repetibilidad (CV%)	1,3	
	Recuperación(%)	99,81	
Concentración Alta 6000 mg/L	Concentración(mg/L) PRIMER DIA	Concentración(mg/L) SEGUNDO DIA	Concentración(mg/L) TERCER DIA
	5947,7	6106,8	6022,2
	5871,3	6082,4	5977,8
	5905,4	6331,9	6066,6
Promedio	5908,1	6173,7	6022,2
Desviación estandar	38,3	137,5	44,4
CV%	0,65	2,2	0,74
	Promedio	6034,7	
	Precisión intermedia(CV%)	2,3	
	Repetibilidad (CV%)	1,4	
	Recuperación(%)	99,39	

Tabla 4.11. Estudio de exactitud y precisión.

Como se observa todos los resultados de repetibilidad, precisión intermedia y recuperación cumplen con los criterios de aceptación establecidos.

Cabe destacar que la principal fuente de error en zona baja (50 mg/L) es la de la exactitud mientras que en zona alta (6000 mg/L) la principal contribución es la de la precisión. Esta casuística está de acuerdo con los mayores valores obtenidos para la residual en zona baja y la influencia de la dilución de muestra en zona alta.

d) Límites de detección (LD) y cuantificación (LC)

Los límites de detección (LD) y cuantificación (LC) se han calculado mediante el método basado en la señal/ruido. Para ello, se ha utilizado el patrón P5 (5 mg/L de cloruros), inyectado en los ensayos de idoneidad.

Se mide experimentalmente el ruido, se multiplica por 3 o por 10 (LD y LC, respectivamente) y se convierte a concentración, utilizando el factor de respuesta del patrón P5.

El valor obtenido para el límite de detección es de 0,16 mg/L y de 0,53 mg/L para el límite de cuantificación. Este valor de LC cumple con el criterio de aceptación que se estableció en 5 mg/L de cloruros (nivel mínimo requerido para el análisis de muestras en rutina).

4.4.3. Incertidumbre

La **incertidumbre del patrón** ($u_{\text{patrón}} \%$) se calcula a partir de la incertidumbre certificada por el fabricante del patrón y la incertidumbre correspondiente a su preparación por dilución.

El valor de la incertidumbre correspondiente al certificado del fabricante se puede calcular a partir del valor nominal. El patrón de cloruros utilizado es de 995-1005 mg/L. Por ello, la tolerancia que introduce el patrón ($\pm 0,5 \%$) se divide entre dos obteniéndose una incertidumbre del 0,25 %.

El valor de la incertidumbre que aporta el proceso de dilución se calcula para el caso más desfavorable. En este caso, el cálculo se realiza para la preparación del patrón de 50 mg/L ya que debido a la pipeta y el matraz utilizados, será el patrón que tenga una mayor incertidumbre debido al proceso de preparación. A la pipeta de 5 mL le corresponde una incertidumbre de 0,10 % y al matraz aforado de 100 mL le corresponde una incertidumbre de 0,040 % (Ver Tabla 4.12).

La suma cuadrática de las contribuciones del patrón certificado y del proceso de dilución permite obtener como incertidumbre del patrón un valor de 0,272 %.

Patrón	Dilución	$u_{\text{certificado}} (\%)$	$u_{\text{pipeta}} (\%)$	$u_{\text{matraz}} (\%)$	$u_{\text{patrón}} (\%)$
P80	20 ml Patrón/250ml	0,25	0,08	0,024	0,262
P50	5 ml Patrón/100ml	0,25	0,10	0,040	0,272
P40	20 ml Patrón/500ml	0,25	0,08	0,020	0,262
P20	10 ml Patrón/500ml	0,25	0,10	0,020	0,270
P10	5 ml Patrón/500ml	0,25	0,10	0,020	0,270
P5	5 ml Patrón/1000ml	0,25	0,10	0,015	0,270

Tabla 4.12. Cálculo de la incertidumbre del patrón.

La **incertidumbre del sistema instrumental** ($u_{\text{sistema instrumental}} (\%)$) se calcula a partir de la información obtenida en el estudio de linealidad (ver Tabla 4.10). Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 4.13.

Concentración (mg/L)	$u_{\text{precisión}} (\%)$ (Nota 1)	$u_{\text{exactitud}} (\%)$ (Nota 2)	$u_{\text{sistema instrumental}} (\%)$
5	0,22	2,6	2,6
10	0,058	0,81	0,81
20	0,12	0,38	0,40
40	0,12	0,12	0,17
50	0,16	0,90	0,91
80	0,017	0,32	0,32

Nota 1: $CV\%/\sqrt{(n)}$ ($n = 3$)

Nota 2: Residual (%)

Tabla 4.13. Incertidumbre del sistema instrumental.

La incertidumbre del sistema instrumental se establece como el peor de los valores obtenidos, es decir, el 2,6 %.

La **incertidumbre asociada a la muestra** (U_{muestra} %) se calcula a partir de la información obtenida en el estudio de la precisión (precisión intermedia) y la exactitud expresada como sesgo (ver Tabla 4.11). Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 4.14.

Concentración (mg/L)	$U_{\text{precisión}}$ (%) (Nota 1)	$U_{\text{exactitud}}$ (%) (Nota 2)	U_{muestra} (%)
50	0,10	1,7	1,7
500	0,44	0,19	0,48
6000	0,76	0,61	0,97

Nota 1: $CV\%/\sqrt{n}$ ($n = 9$)

Nota 2: Sesgo(%)

Tabla 4.14. Incertidumbre asociada a la muestra.

La Tabla 4.15. resume los resultados obtenidos de incertidumbre u (%) a los diferentes niveles de concentración, obtenidos como suma cuadrática de las contribuciones del patrón, sistema instrumental y muestra.

Nivel de concentración (mg/L)	$u_{\text{patrón}}$ (%)	u_{sistema} instrumental (%)	u_{muestra} (%)	u (%)	Tolerancia (%)	Concentración (mg/L)
50	0,27	2,6	1,7	3,1	± 6,2	47-53
500	0,27	2,6	0,48	2,6	± 5,2	474-526
6000	0,27	2,6	0,97	2,8	± 5,5	5670-6330

Tabla 4.15. Incertidumbre y tolerancia.

En relación a los resultados obtenidos para la incertidumbre expandida, no se han obtenido diferencias significativas en el valor de las mismas según el nivel de concentración, con todos los resultados de incertidumbre expandida comprendidos entre $\pm 5,2\%$ y $\pm 6,2\%$. Estos valores se consideran muy satisfactorios, de acuerdo con el criterio de aceptación establecido (20%). No se dispone de valor de referencia para la incertidumbre en la bibliografía consultada, pero teniendo en cuenta los valores correspondientes a la exactitud y la precisión descritos, se obtendría un valor estimado de alrededor del $\pm 13\%$.

Además, para todos los niveles de concentración estudiados, se ha comprobado que la contribución del sistema instrumental es la más importante (2,6%), muy por encima de la contribución del patrón (0,27%) y ligeramente superior a la contribución de la muestra (1,7%, 0,48% y 0,97%, en orden creciente de concentración).

La Figura 4.9 detalla, mediante un diagrama causa-efecto o diagrama de pez, las fuentes de error de cada etapa del procedimiento analítico aplicado. Se pueden observar cuatro espinas principales en este diagrama de pez:

- Preparación patrones: se observa como aportaciones la riqueza de los patrones, la dilución y la inyección.
- Área patrones: las aportaciones de esta espina son debidas a la determinación de las áreas de los patrones y la estimación de la recta de calibrado.
- Preparación muestra: se aprecian como aportaciones la filtración, dilución e inyección de la muestra.
- Área muestra: contribución debida a la determinación de las áreas de la muestra y la interpolación en la recta.

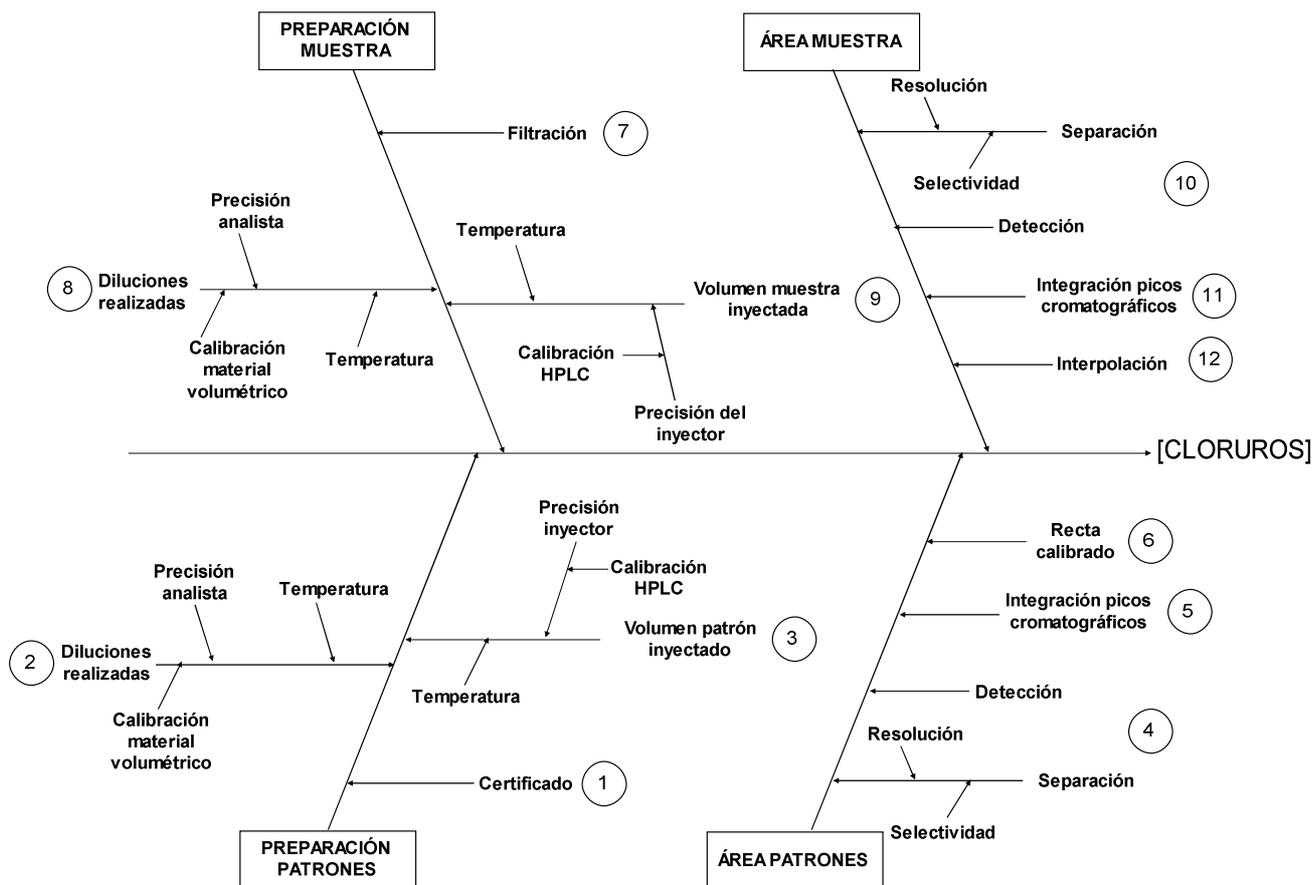


Figura 4.9. Diagrama causa-efecto para la determinación de cloruros en lixiviados.

La Figura 4.10 agrupa las distintas contribuciones dentro de los términos de la Ecuación 1.2 (página 50). Tal y como se observa en dicha figura, estos tres términos incluyen todas las fuentes de incertidumbre del análisis realizado. El término patrón agrupa la contribución de la preparación del patrón; el término sistema instrumental recoge la inyección de los patrones, el proceso cromatográfico y la estimación de la recta de calibrado; y el término muestra la preparación, el proceso cromatográfico de las muestras y la interpolación en la recta de calibrado.

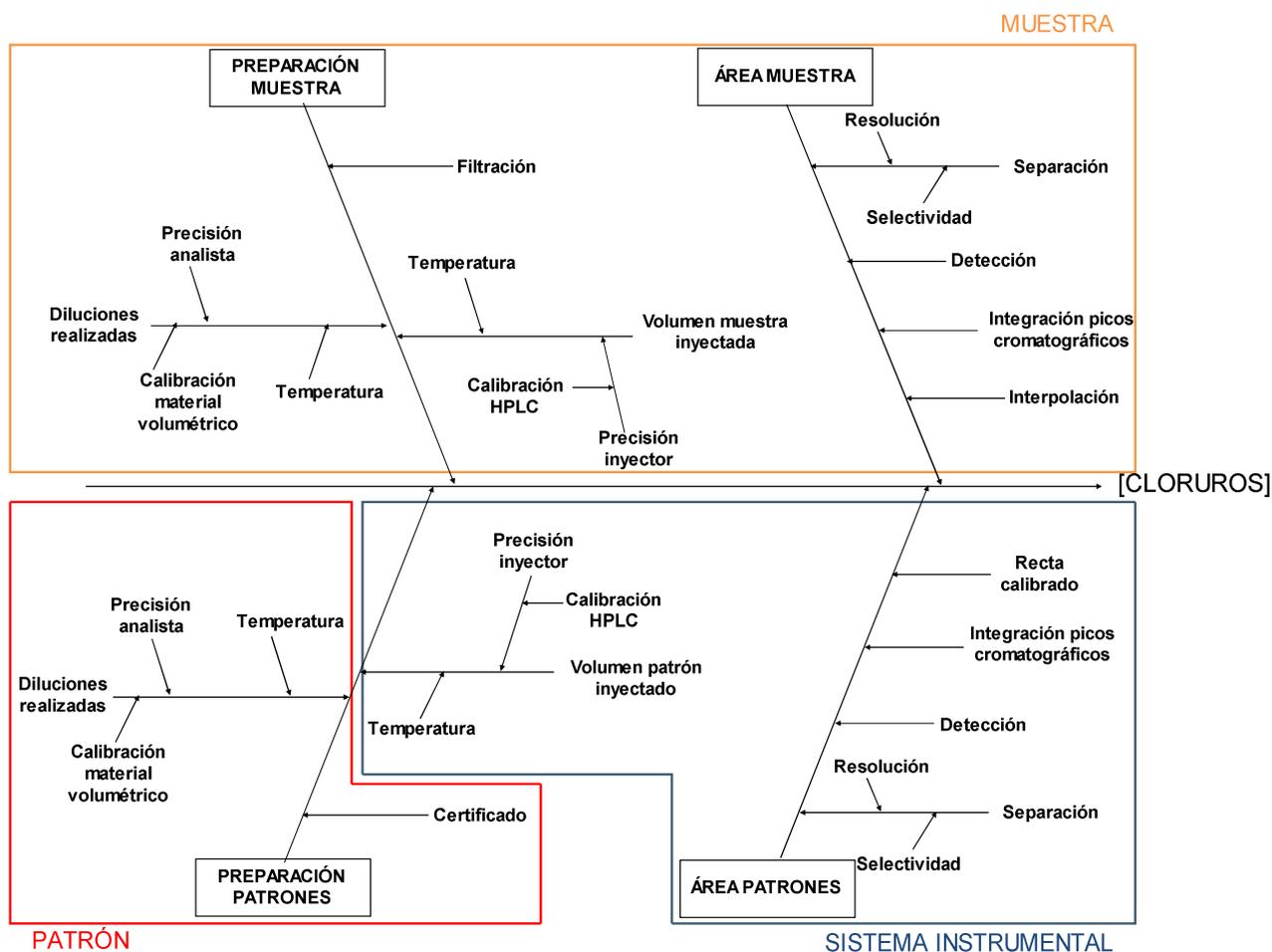


Figura 4.10. Diagrama causa-efecto para la determinación de cloruros en lixiviados agrupado según el origen de la incertidumbre.

4.4.4. Discusión de resultados

En primer lugar, y en relación con la validación del procedimiento de análisis, la tabla que se presenta a continuación resume los parámetros estudiados, los resultados obtenidos y los criterios de aceptación establecidos en la determinación de cloruros por HPLC en muestras de lixiviados (entre 5 mg/L y 10000 mg/L).

Parámetro	Resultado			Criterio de Aceptación Validación	Criterio de Aceptación AOAC	Valoración
	Nivel 50 mg/L	Nivel 500 mg/L	Nivel 6000 mg/L			
Exactitud (Recuperación%)	98,3	99,8	99,4	80-120	95-105	Correcto
Precisión intermedia (CV%)	0,29	1,3	2,3	<15	3,7	Correcto
Selectividad	Ausencia de picos interferentes			Ausencia interferencias	Ausencia interferencias	Correcto
Linealidad (R2)	0,99992			0,990	0,990	Correcto
Linalidad (CV% de los FR)	2,0%			2%	2%	Correcto
Límite de cuantificación (mg/L)	0,53 mg/L			5 mg/L	CV%<20 80<Rec%<110	Correcto

Tabla 4.16. Resumen de resultados: validación de cloruros por HPLC en lixiviados.

Los resultados obtenidos cumplen los criterios de aceptación establecidos en el estudio de validación y con los descritos por las referencias consultadas en la introducción de la presente tesis [AEFI, 2001]:

- Para los parámetros de selectividad y linealidad, los criterios de aceptación utilizados coinciden con los descritos.
- Para los parámetros de exactitud y precisión, los criterios AOAC son más restrictivos que los escogidos para la validación (Tablas 1.6 y 1.7). Tal y como se detalla en la Tabla 4.16, a un nivel de concentración del analito de 1000 mg/L (0,1%) le correspondería una recuperación entre 95-107% y una precisión del 3,7%. Tal y como se ha indicado, los resultados experimentales cumplen también estos criterios.

- Para el parámetro de límite de cuantificación, el criterio establecido en la validación se ha basado en establecer el nivel mínimo requerido para el análisis de muestras en rutina. La AOAC establece que la concentración establecida como LC debe poderse medir con exactitud y precisión adecuadas (habitualmente, $CV\% < 20\%$ y recuperaciones entre 80-110%). Estos criterios se cumplen para el límite establecido de 5 mg/L de cloruros.
- La diferencia en los criterios de aceptación utilizados en el presente trabajo respecto a los AOAC se debe a que en muestras del sector ambiental se aceptan criterios menos restrictivos.

Desde un punto de vista metodológico, el modelo diseñado para el cálculo de la incertidumbre aprovecha los resultados que se obtienen durante la validación de un procedimiento analítico. El modelo establecido para la estimación de la incertidumbre en la determinación de cloruros en lixiviados por cromatografía líquida, incluye los términos correspondientes al patrón, el sistema instrumental y la muestra; y evalúa la contribución de cada uno de ellos.

El conocimiento del procedimiento de análisis ha permitido construir el diagrama de flujo y el diagrama causa-efecto. El diagrama de flujo permite distinguir individualmente cada una de las etapas que pueden aportar incertidumbre. Posteriormente, estas etapas se trasladan al diagrama causa-efecto agrupándolas en aportaciones (espinas principales) e identificando cada una de las fuentes. Finalmente, las fuentes de error se agrupan en las contribuciones del patrón, el sistema instrumental y la muestra. De esta manera, se demuestra que todas las posibles fuentes de error han quedado convenientemente identificadas y se tienen en cuenta para estimar la incertidumbre del procedimiento.

Además, este enfoque permite identificar las fuentes error, priorizarlas según su contribución en la incertidumbre de los resultados y con ello, establecer posibles mejoras en el procedimiento.

4.5. VALIDACIÓN DEL PROCEDIMIENTO DE ANÁLISIS DE ÁCIDOS PALMÍTICO Y ESTEÁRICO POR GC EN MUESTRAS DE ESTEARATO DE MAGNESIO Y ESTIMACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE DE LOS RESULTADOS

4.5.1. Procedimiento de análisis

El estearato de magnesio se utiliza como aditivo especialmente en la industria farmacéutica y en los complementos dietéticos actuando como lubricante, hidrofugante o antiapelmazante. El análisis de ácidos palmítico y esteárico en una muestra de estearato de magnesio se realiza por cromatografía de gases con previa metilación de los ácidos grasos. La cuantificación se realiza mediante normalización interna. Las especificaciones de la Farmacopea Europea indican que la muestra debe contener como mínimo un 40 % de ácido esteárico y el porcentaje total de ácido palmítico y ácido esteárico debe ser como mínimo del 90% [European Pharmacopeia 7.0. (a), 2010].

La preparación de la muestra consiste en la metilación de los ácidos grasos utilizando como agente metilante $\text{CH}_3\text{OH}/\text{BF}_3$. Para ello, se disuelven 0,10 g de la muestra de estearato de magnesio en 5 mL de trifluoruro de boro en metanol, a reflujo durante 10 minutos. Posteriormente, se añaden 4 mL de heptano y se hierve de nuevo durante otros 10 minutos. Después, se deja enfriar y se introducen 20 mL de disolución saturada de cloruro de sodio. Se agita y se deja que se separen las fases acuosa y orgánica. Se toman unos 2 mL de la fase orgánica y se secan con unos 0,2 g de sulfato de sodio anhidro. Se toma 1 mL de la disolución que se enrasa con heptano hasta 10 mL [European Pharmacopeia 7.0. (b), 2010].

Test de idoneidad: La disolución para realizar el test de idoneidad se prepara de la misma manera que si fuera la muestra pero utilizando en su lugar 50 mg de palmitato de metilo y 50 mg de estearato de metilo. Se comprueba, mediante la inyección de esta disolución que el tiempo de retención relativo (r) entre el palmitato de metilo y el estearato de metilo esté alrededor de 0,9 y que la resolución (R_s) entre estos dos picos sea mayor que 5 (Figura 4.11.).

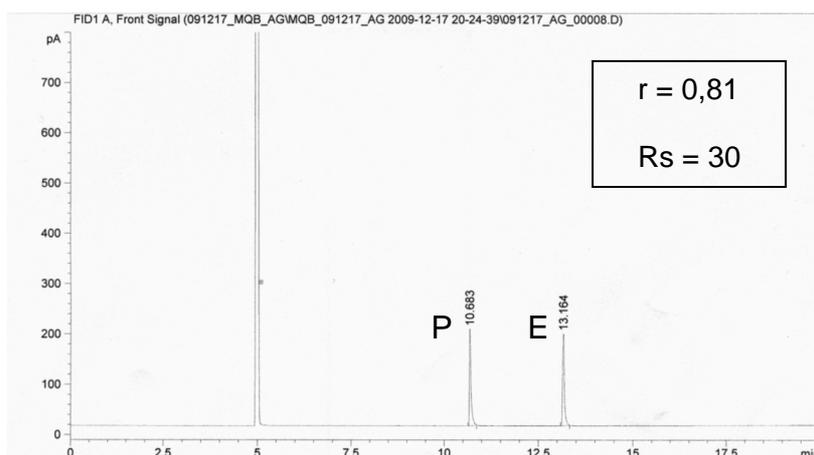


Figura 4.11. Cromatograma de la disolución de referencia.

P = Palmitato de metilo; E = Estearato de metilo

La cuantificación del porcentaje de ácido palmítico, ácido esteárico y el porcentaje total de los dos ácidos se realiza por normalización interna. Para ello, en cada cromatograma de la disolución de la muestra (Figura 4.12) se calcula el porcentaje del área de los picos del palmitato de metilo y del estearato de metilo, respecto al área total descartando el pico del disolvente, los picos presentes en el ensayo en blanco y los picos con un área inferior al 0,05% respecto al total. Así, el porcentaje de ésteres metílicos se asimila directamente al porcentaje de sus ácidos grasos correspondientes.

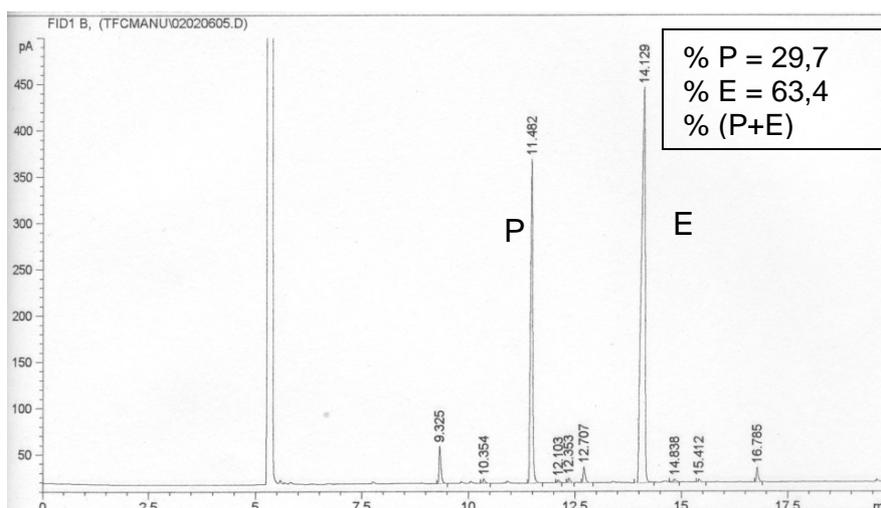


Figura 4.12. Cromatograma de disolución de muestra.

P = Palmitato de metilo; E = Estearato de metilo

En la Figura 4.13 se muestra, mediante un diagrama de flujo, el procedimiento a seguir para realizar el análisis de ácidos grasos en estearato de magnesio.

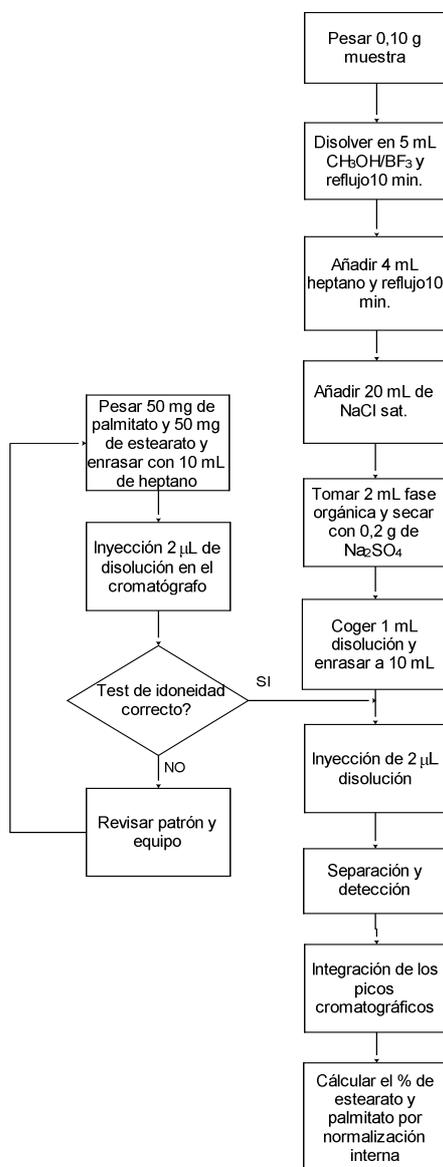


Figura 4.13. Diagrama de flujo para la determinación de ácidos grasos en estearato de magnesio.

4.5.2. Validación

La validación se realiza mediante el estudio de exactitud y precisión. Los resultados obtenidos se utilizarán posteriormente en el cálculo de la incertidumbre.

a) Exactitud

La exactitud se estudia mediante la metilación de patrones de ácido esteárico y ácido palmítico. Se preparan disoluciones que contengan proporciones por encima y por debajo del 40 % de ácido esteárico especificado por la Farmacopea Europea. Para ello, se sigue el mismo procedimiento que se realiza con la muestra, pesando 100 mg según la proporción que interese.

En concreto, se preparan por duplicado patrones con proporciones nominales de 35-65, 40-60, 50-50 y 60-40 % en ácido esteárico y palmítico, respectivamente. Estos patrones, se metilan y analizan siguiendo el mismo procedimiento que para una muestra de estearato de magnesio. La exactitud se calcula como porcentaje de recuperación respecto a la proporción teórica de ésteres (Ver Tabla 4.17).

Proporción nominal	ÁCIDO ESTEÁRICO			ÁCIDO PALMÍTICO		
	Teórica%	Experimental%	Recuperación%	Teórica%	Experimental%	Recuperación%
35-65	35,1	35,5	101,0	64,9	64,4	99,5
	36,0	36,9	102,4	64,0	63,1	98,6
40-60	41,0	42,2	103,0	59,0	57,8	97,9
	40,4	40,7	100,8	59,6	59,3	99,5
50-50	50,1	51,5	102,7	49,9	48,5	97,3
	50,3	50,3	99,9	49,7	49,7	100,1
60-40	60,4	61,6	102,0	39,6	38,4	97,0
	60,0	61,1	101,8	40,0	38,9	97,3
		Promedio%	101,7		Promedio%	98,4
		CV%	1,0		CV%	1,2

Tabla 4.17. Exactitud según proporción nominal de ácido palmítico y ácido esteárico.

De acuerdo con la AOAC (ver Tabla 1.6), el criterio de aceptación establecido para la recuperación es de 98-102%. Los resultados obtenidos para los ácidos palmítico y esteárico (98,4% y 101,7%, respectivamente) cumplen con dicho

criterio. No se observan diferencias significativas entre los patrones preparados con diferentes proporciones de ácidos. Además, hay que destacar que con el diseño realizado, exclusivamente con la etapa de pesada, el error asumido es del 1% ($\pm 0,5$ mg sobre 50mg), siendo los CV% de los valores individuales de recuperación de 1,2% y 1,0%. Por todo ello, se valora satisfactoriamente la exactitud del procedimiento.

b) Precisión

La precisión del método se calcula estudiando la repetibilidad de preparar 5 muestras independientes de estearato de magnesio.

En la Tabla 4.18 se presenta el porcentaje promedio en ácido palmítico y esteárico de cada una de las muestras inyectadas por triplicado.

	% Area estearato metílico	% Area palmitato metílico	% Area palmitato y estearato
Muestra 1	63,1	29,6	92,7
	63,3	29,6	93,0
	63,4	29,7	93,0
Muestra 2	63,3	29,6	92,9
	63,4	29,6	92,9
	63,4	29,7	93,0
Muestra 3	63,9	29,8	93,7
	64,0	29,8	93,8
	63,6	29,7	93,2
Muestra 4	63,7	29,8	93,5
	63,7	29,7	93,4
	63,7	29,8	93,4
Muestra 5	63,5	29,6	93,1
	63,5	29,6	93,1
	63,5	29,6	93,1
Promedio	63,5	29,7	93,2
s	0,2	0,1	0,3
CV(%)	0,4	0,3	0,3

Tabla 4.18. Repetibilidad de la muestra

En este caso, como criterio de aceptación se establece un 2,0 %, que se obtiene de hacer la media entre las dos recomendaciones que realiza AOAC

para las concentraciones de analito más cercanas a las de trabajo: CV% de 1,3 para concentraciones del 100% y CV% de 2,8 para concentraciones del 10% (Ver Tabla 1.7). Como se observa, todos los resultados de la muestra cumplen con el 2% establecido.

4.5.3. Incertidumbre

El cálculo de la incertidumbre del método se realiza según la Ecuación 1.2 (página 50). En este caso, se elimina el término $u_{\text{patrón}}$ debido a que la concentración se calcula por el método de normalización interna suponiendo igualdad de factores de respuesta.

El término de la $u_{\text{sistema instrumental}}$, cuyas fuentes de error provienen de la resolución, del calibrado y de la estabilidad de medida, se considera despreciable. La resolución queda incluida en la precisión, la contribución del calibrado se elimina ya que los patrones no se utilizan para calcular la concentración de la muestra ya que se ha comprobado que los factores de respuesta de los distintos analitos presentes en las muestras son estadísticamente idénticos.

Para realizar esta comprobación se ha inyectado en el cromatógrafo una mezcla de patrones de ésteres metílicos en heptano entre los que hay los analitos de interés. Así, se ha comprobado, con una prueba estadística de Análisis de Varianza, que no hay diferencias significativas entre los factores de respuesta de los ésteres metílicos desde 13 a 21 átomos de carbono [Miller y Miller, 1998]. Para ello, se prepara una mezcla pesando aproximadamente 50 mg de cada éster metílico en un matraz de 50 mL obteniendo una concentración de aproximadamente 1000 mg/L de cada éster. En la Tabla 4.19 se presentan los factores de respuesta de inyectar por duplicado la mezcla preparada de patrones de ésteres metílicos, normalizados respecto al estearato metílico.

	Carbonos	t _{retención} (min)	fR
Laureato de metilo	C13	7,2	1,00
Miristato de metilo	C15	8,6	1,02
Palmitato de metilo	C17	10,6	1,04
Estearato de metilo	C19	13,1	1,00
Oleato de metilo	C19 (=)	13,7	0,96
Araquidato de metilo	C21	15,8	0,95

Tabla 4.19. Factores de respuesta relativos para la mezcla de ésteres metílicos.

Por otra parte, se comprueba también, mediante una prueba estadística de Análisis de Varianza, que la respuesta del ácido esteárico y el ácido palmítico no dependen de la proporción en que se encuentren los dos analitos en la muestra. Esta comprobación se ha realizado con los datos obtenidos al validar la exactitud del método (Tabla 4.17). En la Tabla 4.20 se presentan los factores de respuesta relativos del ácido palmítico, normalizados respecto al ácido esteárico.

Proporción nominal	Ácido esteárico	Ácido palmítico
	fR	fR
35-65	1,00	1,03
40-60	1,00	1,03
50-50	1,00	1,03
60-40	1,00	1,05

Tabla 4.20. Factor de respuesta relativo del éster metílico del ácido palmítico respecto al del ácido esteárico.

El factor de respuesta relativo obtenido para el éster metílico del ácido palmítico es coherente con la diferencia entre las estructuras moleculares de los ésteres metílicos de ambos ácidos.

Por todo esto, para el cálculo de la incertidumbre, sólo se tiene en cuenta la aportación de la u_{muestra} (Ecuación 4.1).

$$u(\%) = \sqrt{u_{\text{patrón}}^2 (\%) + u_{\text{sistema instrumental}}^2 (\%) + u_{\text{muestra}}^2 (\%)} \quad (\text{Ecuación 4.1})$$

Por otra parte, debido a que la cuantificación se realiza calculando el porcentaje de las áreas de los picos del palmitato de metilo y del estearato de metilo respecto al total, la preparación de la muestra tampoco se tendrá en cuenta (Ecuación 4.2).

$$u(\%) = u_{\text{muestra}} (\%) = \sqrt{u_{\text{preparación}}^2 (\%) + u_{\text{precisión}}^2 (\%) + u_{\text{exactitud}}^2 (\%)} \quad (\text{Ecuación 4.2})$$

De este modo, la expresión de cálculo de la incertidumbre se simplifica según se indica en la Ecuación 4.3.

$$u(\%) = u_{\text{muestra}} (\%) = \sqrt{u_{\text{precisión}}^2 (\%) + u_{\text{exactitud}}^2 (\%)} \quad (\text{Ecuación 4.3})$$

La Tabla 4.21 presenta el resumen de los valores obtenidos de incertidumbre.

	$u_{\text{precisión}} (\%)$ (Nota 1)	$u_{\text{exactitud}} (\%)$ (Nota 2)	$u (\%) = u_{\text{muestra}} (\%)$	Tolerancia (%)
Estearato de metilo	0,12	1,7	1,7	±3,4
Palmitato de metilo	0,16	1,6	1,6	±3,2

Nota 1: $CV\%/\sqrt{n}$ ($n=5$)

Nota 2: Sesgo(%)

Tabla 4.21. Incertidumbre.

No se dispone de valor de referencia bibliográfico de incertidumbre como criterio de aceptación. No obstante, teniendo en cuenta los valores de exactitud y precisión recomendados por AOAC se obtendría un valor estimado de ±6,9% como criterio.

La Figura 4.14 detalla, mediante un diagrama causa-efecto, las fuentes de error de cada etapa del procedimiento analítico aplicado. En este caso, los términos correspondientes a los patrones (preparación y área) no aparecen ya que al utilizarse la técnica de normalización interna no intervienen en el cálculo de los porcentajes de ácidos grasos. Por ello, las fuentes de incertidumbre procederían exclusivamente, de la preparación de muestra y la cuantificación de los distintos ésteres metílicos. De esta manera, podemos observar cuatro contribuciones principales a la incertidumbre de determinar el % de ácido palmítico y esteárico: preparación de muestra, determinación del área de palmitato de metilo (área palmitato), determinación del área de estearato de metilo (área estearato) y determinación del área de otros esteres metílicos (área otros ésteres metílicos). La incertidumbre de la preparación de la muestra podría atribuirse a la pesada, la metilación, la dilución y la inyección. Sin embargo este término puede eliminarse al utilizar la técnica de la normalización interna, si se supone que todos los ácidos objeto de estudio presentan el mismo rendimiento en la reacción de metilación y el mismo coeficiente de extracción en la etapa de purificación. Por otro lado, la incertidumbre para determinar las áreas procede de la separación, detección e integración.

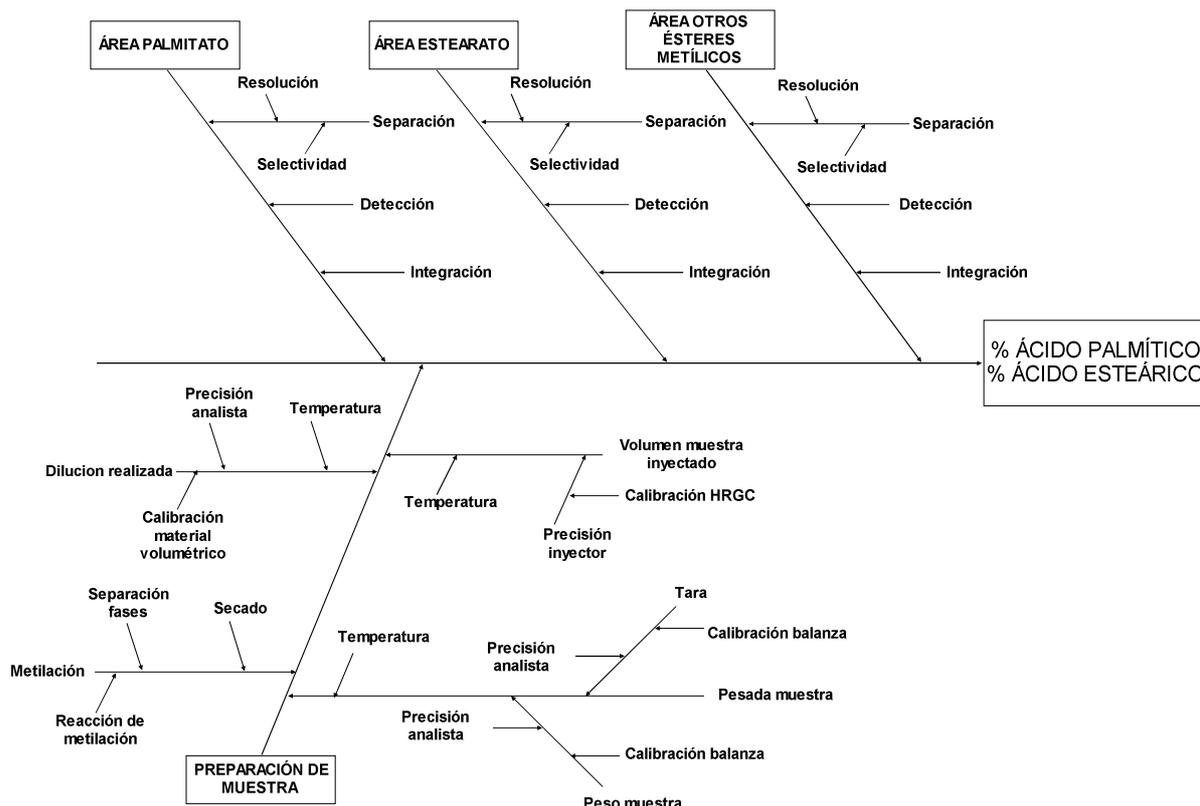


Figura 4.14. Diagrama causa-efecto para la determinación de ácidos grasos en estearato de magnesio.

Así, tal y como se puede observar en la Figura 4.15 todas las fuentes de incertidumbre del análisis realizado proceden únicamente del análisis de la muestra.

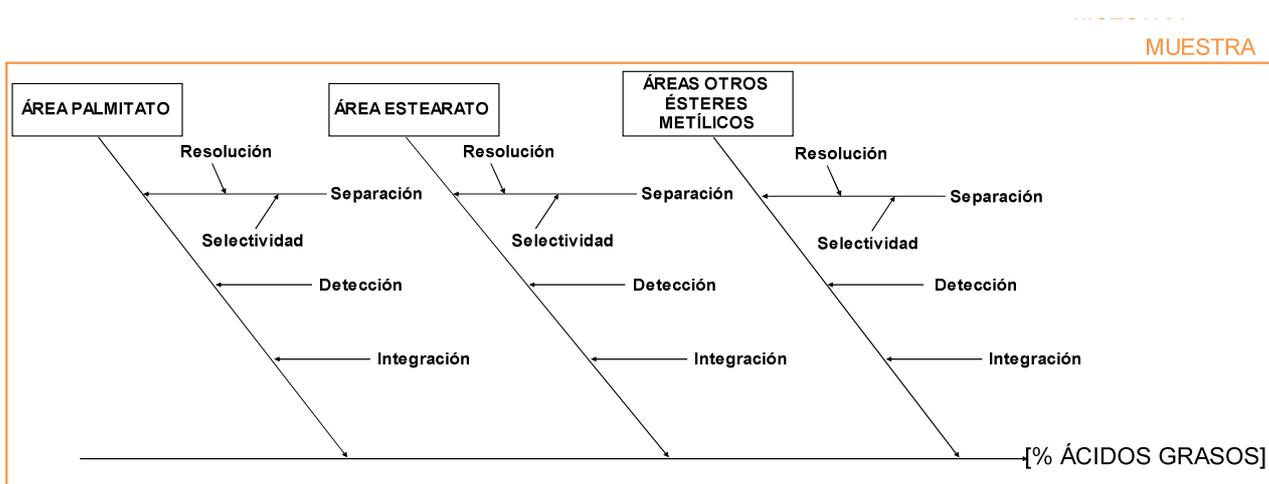


Figura 4.15. Diagrama causa-efecto para la determinación de ácidos grasos en estearato de magnesio sin la contribución de la preparación de la muestra.

4.5.4. Discusión de resultados

En primer lugar, y en relación con la validación del procedimiento de análisis, la Tabla 4.22 resume los parámetros estudiados, los resultados obtenidos y los criterios de aceptación establecidos en la determinación de ácidos palmítico y esteárico por cromatografía de gases en muestras de estearato de magnesio.

Parámetro	Resultado	Criterio de Aceptación	Valoración
Exactitud (Recuperación%)	Palmítico: 98,4%	98-102%	Correcto
	Esteárico: 101,7%		
Precisión (CV%)	Palmítico: 0,29%	<2,0%	Correcto
	Esteárico: 0,35%		
	Palmítico+Esteárico: 0,32%		

Tabla 4.22. Resumen de resultados: validación de ácidos grasos por GC en estearato de magnesio.

El estudio realizado para demostrar que no hay diferencias significativas entre los factores de respuesta de los ésteres metílicos analizados (ver Tablas 4.19 y 4.20) corrobora que la exactitud del método es adecuada.

La incertidumbre estimada en la determinación de ácidos grasos por cromatografía de gases se reduce a la contribución de la muestra. El valor obtenido para una muestra (%) es de 1,7% para el estearato de metilo y del 1,6% para el palmitato de metilo. A estos valores les corresponde una incertidumbre expandida o tolerancia de $\pm 3,4\%$ y $3,2\%$, respectivamente.

El hecho de que la cuantificación se haga por normalización interna ha permitido eliminar dos de los tres componentes el término upatrón y el término usistema instrumental, ya que los patrones no se utilizan para calcular la concentración de la muestra. Por esta misma razón, dentro del término de la muestra se ha eliminado la aportación de la preparación, ya que la preparativa afecta por igual a todos los ácidos grasos.

El diagrama causa-efecto sigue siendo una herramienta fundamental para la identificación de las fuentes de incertidumbre. En este caso, y debido a la cuantificación por normalización interna, las fuentes de error se agrupan exclusivamente en torno a la contribución del análisis cromatográfico de la muestra.

5. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. La cualificación de equipos, combinada con la realización de actividades de mantenimiento preventivo, ha demostrado ser una herramienta útil para aumentar la eficacia de la organización y garantizar la fiabilidad de los resultados, al eliminar o reducir los costes de la no calidad debidos a desviaciones, interrupciones y repeticiones de los ensayos.
2. El test OQ desarrollado para un cromatógrafo de líquidos HPLC permite evaluar el buen funcionamiento del equipo de forma modular (bomba, inyector, horno y detector). Se estudian diversos parámetros para los que no es necesario disponer de columna, como son el test de la lámpara, la exactitud de flujo, el ruido de bomba y detector, la exactitud de composición de fase móvil y la temperatura del horno. Por otra parte, para comprobar la repetibilidad del inyector, linealidad del detector y *carryover* es imprescindible el uso de una columna cromatográfica reservada para el test.
3. Los criterios de aceptación del test OQ se establecen de acuerdo con las necesidades y requerimientos del laboratorio, en base al comportamiento histórico del equipo y considerando las recomendaciones de los fabricantes y otros datos bibliográficos. La utilización de cartas de control proporciona una visión práctica de los resultados en el tiempo y facilita la elección de los criterios de aceptación o límites de ATENCIÓN y ALARMA. Estos criterios no han de ser ni demasiado estrictos ni demasiado amplios: La detección de tendencias hacia la marca de ATENCIÓN ayudan al usuario a adelantarse a fallos del equipo y evitarlos mediante mantenimiento preventivo; mientras que los resultados que exceden la marca de ALARMA, informan de que el equipo trabaja fuera de especificaciones, requiere mantenimiento correctivo y su posterior recualificación.

4. El test PQ desarrollado para HPLC permite realizar una evaluación global del equipo, determinando si el cromatógrafo funciona correctamente para su uso previsto. El test se basa en la inyección de una mezcla de cuatro sustancias y la evaluación de parámetros que nos indicarán si algún módulo del equipo no está funcionando correctamente: Parámetros relacionados con los tiempos de retención informarán sobre la bomba y el horno, ya que cambios en la elución indicarán que flujo, temperatura o composición de la fase móvil han experimentado variaciones respecto a sus condiciones de trabajo habituales; parámetros relacionados con la altura de los picos dan información acerca del funcionamiento del inyector y del detector.
5. La optimización del procedimiento para el análisis de nitrógeno Kjeldahl en muestras de taurina permite llevar a cabo el análisis cumpliendo las especificaciones de la USP: Se ha aumentado la cantidad de muestra, la concentración del ácido sulfúrico utilizado en la valoración y el número de replicados. La elección de estos parámetros se ha basado en los resultados de incertidumbre disponibles de la calibración de la balanza y del sistema instrumental microKjeldahl. En particular, el número de replicados se calcula a partir de la incertidumbre de calibración del sistema instrumental, en lugar del coeficiente de variación de la precisión del método previsto en la fórmula de AEFI.
6. El modelo diseñado para calcular la incertidumbre utiliza los resultados obtenidos en la validación del procedimiento de análisis, agrupándolos en tres términos: patrón, sistema instrumental y muestra. Este enfoque permite identificar las fuentes de error, priorizarlas según su contribución en la incertidumbre de los resultados y, con ello, establecer posibles mejoras en el procedimiento. Este planteamiento es menos laborioso que el método *bottom-up* y la identificación de todas las fuentes de error queda garantizada mediante la aplicación del diagrama causa-efecto. Además, permite obtener el valor de la incertidumbre propia del laboratorio, al utilizar los datos de la validación de sus procedimientos de análisis, a diferencia del método *top-down* que los obtiene de la participación en estudios entre laboratorios.

7. La estimación de la incertidumbre en el análisis de cloruros por HPLC en lixiviados es un ejemplo de cuantificación por patrón externo con recta de calibrado, en el que intervienen los tres componentes que plantea el modelo: patrón, sistema instrumental y muestra. Se han obtenido valores de incertidumbre expandida de $\pm 6,2\%$, $\pm 5,2\%$ y $\pm 5,5\%$, según el nivel de concentración estudiado (50, 500 y 6000 mg/L) y se ha comprobado que la contribución del sistema instrumental es la más importante (2,6%), muy por encima de la contribución del patrón (0,27%) y ligeramente superior a la contribución de la muestra (1,7%, 0,48% y 0,97%, en orden creciente de concentración).

8. La incertidumbre estimada en la determinación de ácidos grasos por cromatografía de gases se reduce exclusivamente a la contribución de la muestra debido a que la cuantificación se realiza por normalización interna sin factores de respuesta. El valor obtenido para u_{muestra} es de 1,7% para el estearato de metilo y de 1,6% para el palmitato de metilo. A estos valores les corresponde una incertidumbre expandida de $\pm 3,4\%$ y 3,2%, respectivamente.

6. BIBLIOGRAFÍA

AOAC Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals, 2002.

AOAC Oficial Methods of Analysis. Appendix D: Guidelines for collaborative Study Procedures to Validate Characteristics of a Method of Analysis, 2002.

AOAC/FAO/IAEA/IUPAC. Principles and Practices of Method Validation. The Royal Society of Chemistry, 2000.

Agilent Technologies. System specifications Agilent 1200. (Fecha de última consulta: 14/12/2014). Disponible en:

<http://www.chem.agilent.com/search/?Ntt=series%201200>

AEFI, Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria. Validación de Métodos Analíticos. Monografía de AEFI, Gispert, La Bisbal (Girona), 2001.

Analytical Methods Committee. Uncertainty of measurement: implications of its use in analytical science. *Analyst* 1995, 120, 2303-2308.

Báguena Polo, J. Gestión por procesos en laboratorios químicos de ensayo y docencia universitaria. Tesis doctoral. URL, IQS, 2008.

Báguena-Polo, J.; Gotor-Navarro, G.; Broto-Puig, F.; Blanco-Roca, M. J. Cálculo de la incertidumbre asociada a los resultados basado en la validación de un procedimiento de análisis. Aplicación en la determinación de cloruros por HPLC en lixiviados. *Afinidad* 2008, 65 (533), 11-19.

Báguena-Polo, J.; Blanco-Roca, M. J. Gestión de equipos en los laboratorios de análisis químico. *Afinidad* 2006, 63 (521), 7-12.

Bansal, S.K.; Layloff, T.; Bush, E.D.; Hamilton, M.; Hankinson, E.A.; Landy, J.S.; Lowes, S.; Nasr, M.M.; St Jean, P.A.; Shah, V.P. *AAPS PharmSciTech* 2004, 5 (1), Article 22.

Barwick, V.J. Sources of uncertainty in gas chromatography and high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 1999, 849 (1), 13-33.

Bedson, P.; Rudd, D. The development and application of guidance on EQ of analytical instruments: High performance liquid chromatography. *Accreditation and Quality Assurance* 1999, 4 (1-2), 50-62.

Bolliet, D.; Poole, C.F. Influence of temperature on retention and selectivity in reversed phase liquid chromatography. *Analyst* 1998, 123, 295-299.

Brosnan, J. T.; Brosnan, M. E. The sulfur-containing amino acids: An overview. *Journal of Nutrition* 2006, 136 (6), 1636-1640.

Burgess, C.; Jones, D.G.; McDowal R.D. Equipment qualification for demonstrating the fitness for purpose of analytical instrumentation. *Analyst* 1998, 123, 1879-1886.

CAC/GL 59, Guidelines on Estimation of Uncertainty of Results, 2006.

Crowther, J.; Dowling, J.; Hartwick, R.; Ciccone, B. Performance Qualification of HPLC Instrumentation in Regulated Laboratories. *LC-GC North America* 2008, 26 (5), 70-82.

Eaton, A.D.; Clesceri, L.S.; Greenberg, A.E. Standard methods for the examination of water and wastewater. Water Environment Federation, Washington DC, 20th Edition, 1998.

ENAC, Buenas Prácticas de Laboratorio. (Fecha de última consulta en: 14/12/2014). Disponible en: <http://www.enac.es/web/enac/actividades-BPL>

Ermer, J.; Nethercote, P. Method Validation in Pharmaceutical Analysis, Wiley-VCH, 2014.

EudraLex, Final version of Annex 15 to the EU Guide to Good Manufacturing Practice: Qualification and validation. EudraLex - Volume 4 Good manufacturing practice (GMP) Guidelines., Brussels, Belgium, 2001. (Fecha de última consulta: 14/12/2014). Disponible en:

<http://ec.europa.eu/health/documents/eudralex/vol-4/>

EURACHEM/CITAC, Guide CG 4 Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement, Third edition, 2012.

EURACHEM Guide. The Fitness for Purpose of Analytical Methods: A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, First edition, 1998.

European Pharmacopoeia 5.0. Chromatographic separation technique. General Notices apply to all monographs and other texts, pp. 69–73.

European Pharmacopoeia 7. 0. (a), Magnesium Stearate, pp. 2418. 2010.

European Pharmacopoeia 7. 0. (b), Fatty acids, composition by gas chromatography Method C, pp. 119, 2010.

Geiss, K. R.; Jester, I.; Falke, W.; Hamm, M.; Waag, K. L. The Effect of A Taurine-Containing Drink on Performance in 10 Endurance-Athletes. *Amino Acids* 1994, 7 (1), 45-56.

ECA, Good Manufacture Practices. (Fecha de última consulta: 14/12/2014). Disponible en: http://www.gmp-compliance.org/eca_link_navigator.html

Gotor, G. Validación de procedimientos cromatográficos para el análisis de palguicidas. Trabajo de final de carrera. URL, IQS, 2008.

Greibrokk, T.; Andersen, T. High-temperature liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 2003, 1000, 743-755.

Grisanti, V.; Zachowski E.J. Operational and performance qualification. *LC-GC North America* 2002, 20 (4), 356-362.

Guidance for Industry. Bioanalytical method validation. FAO. U.S. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration, 2001.

Guidance for Industry. Validation of analytical procedures: Definition and Terminology. U.S. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration Center for Veterinary Medicine, 1999.

Guidance for Industry. Validation of analytical procedures: Methodology. U.S. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration Center for Veterinary Medicine, 1999.

Guidance for methods development and methods validation for the RCRA program. 1992.

Guidelines on method validation to be performed in support of analytical methods for agrochemical formulations. CIPAC 3807.

GUM, Evaluation of measurement data - Guide to the expression of uncertainty in measurement, first edition, 2008.

Gupta, R. C.; Win, T.; Bittner, S. Taurine analogues; A new class of therapeutics: Retrospect and prospects. *Current Medicinal Chemistry* 2005, 12 (17), 2021-2039.

Hall, G; Dolan, J.W. Performance Qualification of LC Systems. *LC-GC North America* 2002, 20 (9), 842-848.

Huber, L. Validation and Qualification in Analytical Laboratories. Informa Healthcare, New York, Second Edition, 2007.

Huber, L.; Welebob, L. Selecting parameters and limits for equipment operational qualification. *Accreditation and Quality Assurance* 1997, 2 (7), 316-322.

Huber, L. Qualification of High-Performance Liquid Chromatography Systems. *Biopharm-the Applied Technologies of Biopharmaceutical Development* 1998, 11 (11), 65.

ICH Harmonised Tripartite Guideline. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1). Noviembre 2005.

ISO 5725-1:1994. Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results - Part 1: General principles and definitions, 1994.

Kaminski, L.; Degenhardt, M.; Ermer, J.; Feussner, C.; Hower-Fritzen, H.; Link, P.; Renger, B.; Tegtmeier, M.; Watzig, H. Efficient and economic HPLC performance qualification. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2010, 51 (3), 557-564.

Konieczka, P.; Namiesnik, J. Estimation of uncertainty in analytical procedures based on chromatographic techniques. *Journal of Chromatography A* 2010, 1217 (6), 882-891.

Krull, I.; Swartz, M. Operational and Performance Qualification. *Lc Gc North America* 2002, 20 (4), 356.

Lima, L. Taurine and its trophic effects in the retina. *Neurochemical Research* 1999, 24 (11), 1333-1338.

Loftus, B.T.; Nash, R.A., Pharmaceutical Process Validation, Marcel Dekker Inc., New York, Vol. 23, 1984.

Maroto, A.; Boque, R.; Riu, J.; Rius, F.X.; Estrategias par el cálculo de incertidumbre. *Química Analítica* 2000, 19, 85.

Masson, P. Quality control techniques for routine analysis with liquid chromatography in laboratories. *Journal of Chromatography A* 2007, 1158 (1-2), 168.

Meyer, V.R. Measurement uncertainty. *Journal of Chromatography A* 2007, 1158 (1-2), 15-24.

Miller, J.C.; Miller J.N. *Statistics for Analytical Chemistry*, Ellis Horwood, Fourth Edition, 1998.

Ministerio de Sanidad y Consumo (Agencia Española del Medicamento) (Fecha de última consulta en: 14/12/2014). Disponible en: <http://www.aemps.gob.es>

Monràs, M.; Margarit, L.; Blanco-Roca, M. J. Validación del procedimiento de análisis de N-Kjeldahl en aguas residuales con el destilador automático PN 1430 Selecta. *Técnicas de laboratorio* 2003, 284, 670-675.

Quintela, M.; Báguena, J.; Broto, F. Margarit, L.; Blanco, M.J. Optimización y revalidación del análisis de nitrógeno por el método Kjeldahl en muestras de taurina, *Afinidad* 2009, 66 (541), 200-205.

Quintela, M.; Báguena, J.; Gotor, G.; Blanco, M.J.; Broto, F. Do we agree with liquid chromatograph operational qualification provided from manufacturers?, *Afinidad* 2013, 70 (561), 6-12.

Quintela, M.; Bagueña, J.; Gotor, G.; Blanco, M.J.; Broto F. Estimation of the uncertainty associated with the results based on the validation of chromatographic analysis procedures: application to the determination of chlorides by high performance liquid chromatography and of fatty acids by high resolution gas chromatography. *Journal of Chromatography A* 2012, 1223, 107-117.

Ratamess, N. A.; Hoffman, J. R.; Ross, R.; Shanklin, M.; Faigenbaum, A. D.; Kang, J. Effects of an amino acid/creatine energy supplement on the acute hormonal response to resistance exercise. *International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism* 2007, 17 (6), 608-623.

Real Decreto 1369/2000, de 19 de julio, por el que se establecen los principios de buenas prácticas de laboratorio y su aplicación en la realización de estudios no clínicos sobre sustancias y productos químicos.

The Merck Index; Whitehouse Station, N.J. 14th edition, 2006.

UNE-EN ISO 9000:2005, Sistemas de gestión de la calidad. Fundamentos y vocabulario.

UNE-EN ISO 9001:2008, Sistemas de gestión de la calidad. Requisitos.

UNE-EN ISO/IEC 17025:2005, Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración.

USP 30-NF 25 (a). Determination de Nitrógeno, Chapter 461, 2007.

USP 30-NF 25 (b) Monografía de la taurina, 2007.

USP 34-NF 29 (a), Chromatography. Chapter 621, 2011.

USP 34-NF 29 (b), Analytical Instrument Qualification, Chapter 1058. 2011.

USP 30-NF 25. Validación de procedimientos farmacopeicos. Información general. Chapter 1225, 2007.

Waters Corporation (a), Waters 515 HPLC Pump Specifications. (Fecha de última consulta en: 14/12/2014). Disponible en:

<http://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720000336en.pdf>

Waters Corporation (b), Water 717 Plus Autosampler Specifications. (Fecha de última consulta en: 14/12/2014). Disponible en:

<http://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720000435en.pdf>

Waters Corporation (c). Waters 2489 UV/Visible Detector Operator's Guide. (Fecha de última consulta en: 14/12/2014). Disponible en:

<https://www.waters.com/webassets/cms/support/docs/71500142102ra.pdf>

ANEXOS

El trabajo realizado en la presente tesis doctoral ha dado lugar a la publicación de los siguientes artículos:

Quintela, M.; Báguena, J.; Gotor, G.; Blanco, M.J.; Broto, F. Do we agree with liquid chromatograph operational qualification provided from manufacturers?, *Afinidad* 2013, 70 (561), 6-12.

Quintela, M.; Báguena, J.; Broto, F. Margarit, L.; Blanco, M.J. Optimización y revalidación del análisis de nitrógeno por el método Kjeldahl en muestras de taurina, *Afinidad* 2009, 66 (541), 200-205.

Quintela, M.; Baguena, J.; Gotor, G.; Blanco, M.J.; Broto F. Estimation of the uncertainty associated with the results based on the validation of chromatographic analysis procedures: application to the determination of chlorides by high performance liquid chromatography and of fatty acids by high resolution gas chromatography. *Journal of Chromatography A* 2012, 1223, 107-117.