

EL METODO DE ANALISIS PARA LOS ESTUDIOS DE ESTABILIDAD Y DE BIODISPONIBILIDAD DE MEDICAMENTOS. PARTE II

LUZ STELLA OSPINA DE NIGRINIS *

RESUMEN

La aceptabilidad de un método de análisis es determinada en términos de la validación. En este segundo artículo se tratan aspectos relacionados con la validación de los métodos de análisis para el estudio de la estabilidad y de la biodisponibilidad de medicamentos. En esta ocasión se tratan conceptos relacionados con la precisión (repetibilidad, reproducibilidad, estudios colaborativos), la linealidad, la exactitud y la robustez del método, subrayando la importancia de la estadística en su evaluación.

SUMMARY

The acceptability of an analytical method is assessed in terms of validation. This second article represents aspects of validating analytical methods for stability and bioavailability of drugs. In this paper will be discussed precision (repeatability, reproducibility, collaborative studies), linearity, accuracy and ruggedness. Statistical principles underlying these concepts are presented.

INTRODUCCION

No cabe ninguna duda, sobre la necesidad y la importancia de validar los métodos de análisis utilizados para el estudio de la estabilidad y de la biodisponibilidad de los medicamentos. En el caso de los métodos instrumentales, dada la responsabilidad y el compromiso de la industria farmacéutica con la salud de los usuarios de sus productos y la creciente exigencia y rigurosidad por parte de los organismos reguladores encargados de vigilar la calidad de los medicamentos, en el diseño de

la instrumentación más reciente que se encuentra en el mercado, se han incorporado determinadas funciones como herramientas para algunos cálculos que facilitan la validación de la metodología analítica.

Sin embargo, es muy importante que quienes trabajan en este campo, conozcan la estadística básica fundamental para la validación de cada uno de los atributos del método. Sobre este tema, la literatura especializada ha proporcionado importante información (1, 2, 3, 4, 5).

Para complementar los aspectos tratados en la parte I sobre "El método de análisis para los estudios de estabilidad y de biodisponibilidad de medicamentos", en la parte II se tratarán algunos conceptos sobre: la precisión, la linealidad, la exactitud y la robustez del método de análisis para estos estudios.

VALIDACION DE LOS ATRIBUTOS DEL METODO DE ANALISIS

1. Precisión

La precisión de un método de análisis es la propiedad que hace referencia al grado de concordancia, entre los resultados obtenidos cuando el método se aplica repetidamente a diferentes muestreos hechos a partir de una misma muestra homogénea.

La no concordancia entre el valor de la concentración aceptado como verdadero, y el valor experimental es el resultado de la influencia de los posibles errores, sistemáticos y aleatorios, que pueden presentarse durante el desarrollo de todo el procedimiento analítico.

Es bien sabido que la mejor estimación de un número de observaciones, respecto a diferentes muestreos a partir de una muestra homogénea es la media aritmética y que la precisión de este estimador se incrementa al aumentar el número de observaciones, siempre y cuando se puedan controlar los errores sistemáticos.

* Universidad Nacional, Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia, A.A. 14490. Santafé de Bogotá. Colombia.

Los estimadores de la dispersión de las diferentes observaciones respecto a la media aritmética son la varianza (s^2), la desviación estándar (s), y la desviación estándar relativa o coeficiente de variación (CV). Estos estimadores son una medida de la precisión del método de análisis. (6,7)

En la validación de un método de análisis, para los estudios de estabilidad, biodisponibilidad, bioequivalencia, farmacocinéticos, y en general para el seguimiento de la calidad de los medicamentos, la precisión asociada a los errores aleatorios se evalúa desde el punto de vista de la **repetibilidad** y de la **reproducibilidad**. (5,8)

La repetibilidad y la reproducibilidad son dos conceptos que permiten evaluar la precisión de un método de análisis de acuerdo con un procedimiento establecido, con un diseño experimental apropiado, con un análisis estadístico pertinente y con la interpretación de los resultados.

1.1. Repetibilidad.

La repetibilidad de un método de análisis hace referencia a la concordancia entre los resultados obtenidos con el mismo método, en muestras idénticas y bajo las mismas condiciones, es decir, el mismo experimentador, con los mismos instrumentos, los mismos reactivos, en el mismo laboratorio y durante el mismo día. Es importante también evaluar la repetibilidad entre días. La repetibilidad se expresa como la desviación estándar, o como la desviación estándar relativa o coeficiente de variación.

La magnitud del coeficiente de variación está relacionada con los valores de la concentración mínima y máxima cuantificable. Es usual expresar gráficamente la variación del coeficiente de variación en función de la concentración, conociéndose esta expresión como el perfil de precisión del método. (Figura 1).

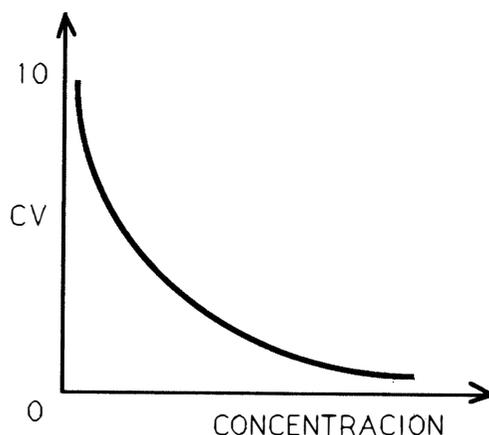


FIGURA 1. Perfil de precisión. Representación gráfica del coeficiente de variación en función de la concentración.

Generalmente, en la vecindad de la concentración mínima cuantificable, la variabilidad de la respuesta es grande, disminuyendo a medida que se incrementa la concentración, llegando a ser constante este valor en la vecindad de la concentración máxima cuantificable. De acuerdo al método de análisis se aceptan coeficientes de variación que pueden fluctuar entre el 2% y el 10%. En algunos métodos de análisis para los estudios de biodisponibilidad, debido a las múltiples fuentes de variación, el coeficiente de variación puede alcanzar valores del 15% y aún hasta del 20% en la cercanía de la cantidad mínima cuantificable. (9)

1.2 Reproducibilidad.

Usualmente la reproducibilidad se valida evaluando la concordancia entre resultados independientes obtenidos por diferentes experimentadores, utilizando el mismo método de análisis, en diferentes días, en el mismo y/o diferentes laboratorios, empleando el mismo y/o diferentes instrumentos.

El diseño más simple para un estudio de reproducibilidad, consiste en registrar los resultados obtenidos por dos experimentadores, para una misma muestra, en dos días diferentes. El análisis estadístico de esos resultados se hace empleando el análisis de varianza (ANOVA) correspondiente a un experimento con dos factores de clasificación con réplicas, para estudiar la magnitud de las fuentes de variación y el error residual o experimental.

1.3 Estudios colaborativos.

La aceptación de un método de análisis generalmente es determinada en función del estudio de la precisión del método, específicamente en lo relacionado con la repetibilidad y la reproducibilidad. Estos estudios son realizados en diferentes laboratorios y se conocen como estudios colaborativos. Evidentemente, la precisión del método tiene su máxima expresión en los estudios colaborativos. (7,10,11,12,13)

El error dentro del laboratorio corresponde a la repetibilidad del método y la suma de los errores entre laboratorios y la interacción con la muestra, determinan la reproducibilidad.

La organización y la interpretación de los resultados de los estudios colaborativos han sido objeto de análisis y de acuerdos de las instancias reconocidas internacionalmente como: la Organización Internacional para la Estandarización de Normas, con sede en Ginebra, conocida con las siglas **ISO**. La norma de esta organización para la determinación de la repetibilidad y de la reproducibilidad de un método de análisis es la norma ISO-5725. (14)

También se reconoce el esquema de los diseños recomendados por el Instituto de Estandarización de Normas de Holan-

da, con sede en la Haya, para los estudios colaborativos entre laboratorios, para evaluar la precisión de un método de análisis. La norma de este Instituto es conocida como la NEN 6303. (15)

La Asociación Oficial de Química Analítica, AOAC, también publicó en 1990 las guías para desarrollar estudios colaborativos y los procedimientos para validar las características de un método de análisis. (16)

La FDA ha publicado la guía 21 CFR 1090 para la validación de métodos de análisis, pero no hace énfasis en los estudios colaborativos. (17)

En general, las guías mencionadas se ocupan de definir en forma detallada, los criterios de naturaleza técnica y administrativa que deben tenerse en cuenta para la realización de los estudios colaborativos. Definen los principios básicos respecto al número de laboratorios participantes, número de muestras, número de réplicas realizadas por cada laboratorio, sobre la preparación de los materiales, definen las obligaciones de los laboratorios participantes, la clase de análisis estadísticos, especificando el número de resultados aceptados según el número de réplicas para cada muestra y para cada laboratorio, la eliminación de cualquier laboratorio que sea inconsistente por dar resultados altos o bajos, cómo corregir los datos aberrantes, cómo examinar la varianza dentro de muestras y entre réplicas para evaluar la repetibilidad y la reproducibilidad y por consiguiente la validez del análisis de varianza, cómo determinar la varianza entre laboratorios y la interacción muestra laboratorio y entre réplicas, cómo calcular la repetibilidad y la reproducibilidad del método y finalmente cómo elaborar el informe del estudio.

2. Linealidad

Un método de análisis presenta regresión lineal, cuando al aplicar el método se obtienen respuestas, las cuales directamente o después de una transformación matemática, son proporcionales a la concentración del compuesto analizado dentro de un intervalo (rango) de concentraciones apropiadas.

En los estudios de estabilidad, de biodisponibilidad, de bioequivalencia y farmacocinéticos se diferencia entre la regresión lineal del sistema y la regresión lineal del método.

La regresión lineal de un sistema se estudia, construyendo una curva de calibración utilizando varias concentraciones, a partir de una solución de un patrón de referencia del compuesto en estudio (fármaco, metabolitos, o producto de degradación) trabajando un número apropiado de réplicas de cada concentración.

En los estudios de biodisponibilidad, la regresión lineal del método se evalúa a partir de muestras preparadas adicionando concentraciones conocidas de un patrón de referencia del compuesto en estudio, a sangre, plasma, suero, saliva, orina o cualquier otro fluido biológico, proveniente de un pool obtenido de voluntarios sanos que no hayan recibido recientemente un tratamiento farmacológico. La concentración por unidad de volumen de estas muestras debe ser igual a las concentraciones utilizadas para evaluar el sistema. En la validación de la regresión lineal del método para un estudio de estabilidad de medicamentos, las muestras se obtienen adicionando concentraciones conocidas del fármaco o de los productos de degradación, a los auxiliares de formulación o placebos de la forma farmacéutica en estudio.

El número de concentraciones y el número de réplicas empleadas para la validación de la regresión lineal, en los métodos de análisis para los estudios de estabilidad y biodisponibilidad, depende del criterio del experimentador, del análisis estadístico propuesto, de la variabilidad permitida en los resultados obtenidos o de los intervalos de confianza aceptados, como también de factores prácticos como: tiempo requerido para el análisis y del costo de los mismos.

En el caso de los estudios de biodisponibilidad, de bioequivalencia o farmacocinéticos se recomienda utilizar por lo menos tres concentraciones: la concentración más baja debe estar muy cerca de la cantidad mínima cuantificable, la concentración más alta debe corresponder a una concentración mayor a la concentración máxima cuantificable en el fluido biológico (C_{max}), pero debe estar dentro del intervalo de concentraciones en el que se obtiene regresión lineal, y una concentración intermedia entre estos dos valores. Es importante que dentro de este intervalo de concentraciones, queden involucrados los valores de concentración correspondientes a las fases de absorción y de eliminación del fármaco.

En los estudios de estabilidad como en el caso de la biodisponibilidad, se recomienda el empleo de por lo menos tres valores de concentración, los cuales pueden cubrir entre el 0% y el 120%, el 10% y el 125%, el 50% y el 150% o entre el 70% y el 130% de la cantidad etiquetada del producto. Al respecto hay una diversidad de criterios, lo apropiado es trabajar dentro de un intervalo que cubra por lo menos un valor por debajo y un valor por encima de la cantidad etiquetada. (5,18,19)

Si cada una de las concentraciones se trabajara con un número infinito de réplicas, se tendría una **distribución normal** de respuestas para cada concentración. Todas las concentraciones X_1, \dots, X_∞ tendrán una media μ_1 . En este caso las varianzas $\sigma^2_1, \dots, \sigma^2_\infty$ de las posibles distribuciones normales son iguales y esto se conoce como **homocedasticidad**. La

función además debe ser **monótona** es decir que cuando la concentración X crece o disminuye la respuesta Y crece o disminuye respectivamente.

La función $Y = f(X)$ debe cumplir con las hipótesis de **normalidad, homocedasticidad y monotonía**. Si se tuvieran infinitas respuestas se obtendría la recta ideal $\mu = \alpha + \beta x$.

En la práctica se trabaja con una muestra poblacional de concentraciones con réplicas, obteniendo la recta correspondiente a $y = a + bx$.

Las respuestas de las réplicas para cada valor de concentración se tratan matemáticamente para obtener la recta de mejor ajuste por mínimos cuadrados. La recta obtenida es una estimación de la verdadera recta y se considera estadísticamente válida, si los valores de respuesta no se desvían significativamente respecto al valor medio de la recta de mejor ajuste y la pendiente **b** es significativamente diferente de 0. Además, la recta obtenida con los métodos químicos instrumentales, para los estudios de estabilidad y de biodisponibilidad de medicamentos debe ser convergente al origen, es decir, que el intercepto **a** no debe ser significativamente diferente de 0. Para demostrar estadísticamente la regresión, el desvío de linealidad y la convergencia al origen, existen varias pruebas o tests estadísticos.

2.1 Regresión lineal y desvío de linealidad.

Para demostrar si hay o no regresión se emplean pruebas como: el análisis de varianza (ANOVA), el test de hipótesis para la pendiente **β** y para el coeficiente de correlación **r**. (7, 20, 21, 22)

Si el sistema o el método presentan regresión, el ANOVA debe mostrar diferencia significativa **entre** concentraciones, de acuerdo a las condiciones experimentales establecidas (error α y grados de libertad). Con este mismo análisis, si la diferencia **dentro** de concentraciones no es significativa, se demuestra que no hay desvío de la linealidad.

El test de hipótesis para la pendiente es muy usado para demostrar regresión. El sistema o el método presentan regresión, si la pendiente es significativamente diferente de 0. (21)

El coeficiente de correlación **r** se usa frecuentemente como criterio de evaluación para un buen ajuste de un modelo de regresión lineal (20, 21). Este criterio ha sido controvertido por carecer de suficiente sensibilidad y no es muy recomendado para demostrar regresión lineal. (22, 23)

El ANOVA puede ser la prueba más indicada para la validación de la regresión lineal, pues permite evaluar las

fuentes de variación **entre** las diferentes concentraciones (regresión) y **dentro** de respuestas para una misma concentración -réplicas- (desvío de linealidad). Desde luego se requiere de un diseño experimental con un número apropiado de concentraciones y de réplicas.

Parece no haber uniformidad de criterio entre quienes trabajan en la validación de métodos de análisis, para los estudios de estabilidad y de biodisponibilidad de medicamentos, sobre cuáles pruebas estadísticas emplear para demostrar regresión y desvío de linealidad.

2.2 Convergencia al origen.

Los métodos químicos instrumentales empleados en los estudios de estabilidad y de biodisponibilidad de medicamentos, además de mostrar regresión y no desvío de la linealidad, tanto el sistema como el método deben mostrar convergencia al origen. El intercepto no debe ser significativamente diferente de 0 y para demostrarlo estadísticamente se usa la prueba de hipótesis para el intercepto α . La no convergencia al origen puede ser debida a errores sistemáticos constantes no controlados.

2.3 Precisión de la recta.

A partir de la recta de mejor ajuste por mínimos cuadrados, se establecen los intervalos o límites de confianza para la pendiente **b**, para el intercepto **a**, y para la recta, para una determinada probabilidad de error y para los grados de libertad de la regresión (7, 20, 21, 22). Es importante anotar que cuando se interpola en la recta ajustada por mínimos cuadrados, se hace sobre un valor medio el cual tiene un error, por lo tanto la interpolación es afectada por el mismo error. La representación gráfica de los intervalos o límites de confianza corresponden a una hipérbola.

3. Exactitud

La exactitud de un método de análisis ha sido definida, como la diferencia entre el valor de una respuesta (concentración, cantidad), aceptado como verdadero y el valor encontrado experimentalmente. Un método de análisis no puede ser exacto si no es específico. La falta de concordancia entre estos valores es debida a los errores aleatorios y a los errores sistemáticos del método, por lo cual es indispensable cuantificar la magnitud de cada uno de esos errores.

W. J. Youden, ha sido uno de los investigadores que ha contribuido notablemente al estudio de la exactitud del método de análisis y al análisis de los errores sistemáticos. Los trabajos de Youden han contribuido a hacer claridad entre la

exactitud y la precisión y a conocer las limitaciones de la estadística, para el análisis de los errores sistemáticos. (7,22,24,25). Los errores sistemáticos más frecuentes, son los errores proporcionales y los errores constantes. Los primeros pueden deberse a diferentes causas propias del método, por ejemplo, una extracción deficiente o incompleta, debido a un ajuste inadecuado del pH del medio, o a la elección equivocada del disolvente, la adsorción parcial del compuesto a los materiales de los recipientes usados en el proceso; en la medida en que se incrementa la concentración del compuesto, el error crece proporcionalmente, este error está directamente relacionado con la sensibilidad del método. El error constante es debido al blanco; generalmente esta clase de error se elimina restando el valor de la respuesta del blanco al hacer el ajuste del instrumento.

En la evaluación de la exactitud de un método de análisis a través de estudios colaborativos, los errores sistemáticos son de común ocurrencia entre los laboratorios y pueden variar de uno a otro. Las impurezas de algunos reactivos varían de acuerdo a su procedencia y esto afecta los resultados; los sistemas de calibración de los instrumentos pueden ser diferentes; el ambiente de cada laboratorio, los equipos y la forma de desarrollar el método determinan un error sistemático para el laboratorio.

Entre las varias pruebas estadísticas que pueden emplearse para conceptuar sobre la exactitud del método se conocen la prueba t de Student, cuando se comparan dos medias; si se comparan más de dos métodos se usa el ANOVA para comparar las medias y la prueba de Bartlett para comparar las varianzas. Para muestras pareadas se puede usar la prueba de Wilcoxon la cual permite comparar dos métodos con n muestras. (26).

Son varios los métodos que se usan para el estudio de la exactitud de un método de análisis, y en el caso de los estudios de estabilidad y de biodisponibilidad, tal vez los más empleados son la comparación de métodos por regresión lineal y el porcentaje de recuperación.

3.1 Comparación de métodos por regresión lineal

Este método corresponde al criterio de W.J. Youden y consiste en comparar las respuestas obtenidas para una muestra de un patrón de referencia a varios niveles de concentración con un método considerado exacto, con las respuestas obtenidas para las mismas concentraciones cuando se aplica el método en estudio, o adicionando cantidades conocidas de un patrón del compuesto a un placebo de una forma farmacéutica o a una muestra biológica de voluntarios sanos que no hayan ingerido ningún medicamento. Se desarrolla el método que se

está evaluando con cada una de las muestras y se compara la cantidad encontrada con la cantidad adicionada. (18,24).

La variable X corresponde a la respuesta del método considerado exacto o a la cantidad conocida adicionada y la variable Y corresponde a la respuesta del método que se está evaluando o a la cantidad encontrada.

Estadísticamente, el análisis de regresión lineal es el mejor estimador de la exactitud del método que se está validando, cuando se compara con un método de referencia considerado exacto, para el cual se estima que no existe sesgo ni de método ni de laboratorio; o cuando se relaciona la cantidad adicionada de un patrón a un blanco, con la cantidad encontrada, después de aplicar el método que se está validando. El número de concentraciones, el intervalo y el número de réplicas se definen según los criterios indicados para la validación de la linealidad.

Para demostrar la exactitud del método que se está validando, lo más indicado es hacer un ANOVA para la regresión y realizar las pruebas para la pendiente ($\beta = 1$), y de convergencia al origen ($\alpha = 0$).

Aunque es necesario demostrar que la pendiente del método no es significativamente diferente de 1, para algunos fármacos, productos de degradación, metabolitos y en general para varios compuestos, debido a la complejidad del método, especialmente en la etapa de la limpieza de la muestra, no es posible recuperar el 100% del compuesto presente, como resultado de la incidencia de los errores sistemáticos proporcionales del método.

Los errores sistemáticos se evidencian gráficamente, pues la recta de calibración obtenida para el sistema con concentraciones crecientes del patrón de referencia, no tiene la misma pendiente que la de la recta obtenida para el método, es decir que la sensibilidad es diferente para el sistema y para el método.

En tal caso, el desvío del método está dado por la diferencia entre la pendiente de la recta ideal y la pendiente de la recta obtenida experimentalmente ($1 - b$), expresada en porcentaje. Por ejemplo, si el valor de la pendiente de la recta experimental (método) es 0.7, el desvío del método es del 30% es decir, que el porcentaje de recuperación es del 70%

3.2 Porcentaje de recuperación

La forma más usual de evaluar la exactitud del método de análisis es a través del porcentaje de recuperación. En el caso de la comparación de un método considerado exacto con el

método que se está validando, se acepta que los valores de concentración encontrados con el método exacto, son los valores verdaderos de concentración. El porcentaje de recuperación se calcula así:

$C_1/C_2 \times 100 = \%$ de recuperación. C_1 = Concentración encontrada por el método en estudio; C_2 = Concentración encontrada por el método exacto. El número de concentraciones y el número de réplicas las define el experimentador, generalmente se usan diseños con tres concentraciones y tres réplicas. Las concentraciones corresponden a un valor por debajo y a un valor por encima de la cantidad etiquetada para los estudios de estabilidad. En los estudios de biodisponibilidad el valor intermedio corresponde al C_{max} .

4. Robustez

La robustez del método de análisis, se define como el grado de reproducibilidad de los resultados obtenidos para las mismas muestras bajo variadas condiciones, como diferentes experimentadores, con diferentes lotes de reactivos, diferentes temperaturas a diferentes pH, etc.

W. J. Youden fue el primero en sugerir que un proceso analítico debe ser sólido, robusto, vigoroso, es decir que debe ser resistente a pequeños cambios o desviaciones inevitables a las especificaciones en el protocolo del método y además comprobó que no es excesivo el tiempo requerido para evaluar la robustez del método, si el diseño experimental es el apropiado

El diseño básico, es el llamado el diseño con varios factores de clasificación, con réplicas para estudiar el significado de las fuentes de variación y el error residual. El estudio estadístico más apropiado es el ANOVA. (16)

En los métodos de análisis para los estudios de biodisponibilidad de medicamentos, generalmente no se hace énfasis en la validación de este atributo.

COMENTARIOS

Si la elección de los posibles métodos instrumentales para un estudio de estabilidad o de biodisponibilidad de medicamentos, o de un fármaco y de sus productos de degradación o de biotransformación depende de la estructura del compuesto, la elección del método de cuantificación, además está condicionada por la especificidad y la sensibilidad del método. Esto en gran parte depende de la complejidad, de la estabilidad y de la concentración de los componentes de la muestra.

En los estudios de biodisponibilidad, de bioequivalencia y farmacocinéticos, la estabilidad de la muestra biológica es un

factor crítico, por lo cual deben establecerse con certeza las condiciones de manejo durante la toma de la muestra, el almacenamiento y el procesamiento hasta la obtención de los resultados.

La necesidad de estar cada vez más cerca del método óptimo de análisis, con el objeto de hacer el seguimiento de la calidad de los medicamentos y así garantizar su seguridad y su eficacia, lo cual es inherente a la estabilidad y a la biodisponibilidad, exige que continuamente se esté investigando y revaluando los métodos de análisis.

Es indiscutible la importancia y la exigencia de validar el método de análisis, en cuanto a los atributos señalados. La credibilidad de un estudio de estabilidad o de biodisponibilidad, depende de la validez de los resultados obtenidos con el método de análisis diseñado para tal efecto. Sin embargo la validez del método no es suficiente; es también indispensable el conocimiento amplio del tema, de las Buenas Prácticas de Laboratorio, la rigurosidad, el criterio, la habilidad y la destreza del experimentador o analista. Todo esto constituye un factor crítico en el desarrollo del proceso y en la interpretación de los resultados.

Bibliografía

1. H. MARCHANDISE, *J. Anal. Chem.* **345**, 82 (1993)
2. J. R. LANG, S. BOTTON. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **9**, 357 (1991)
3. J. R. LANG, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **9**, 435 (1991)
4. J. B. CASTLEDINE, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **11**, 1 (1993)
5. G. S. CLARKE, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **12**, 643 (1994)
6. H.C. HAMAKER, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **69**, 417 (1986)
7. G.T. WERNIMONT, "Use of Statistics to Develop and Evaluate Analytical Methods", Ed. por William Spendle, Airlington, 1990, pp 24-73
8. M.J. BOOKBINDER AND K.J. PANOSIAN, *Clin. Chem.* **32**, 1734 (1986)
9. V.P. SHAH, K.K. MIDHA, S. DIGHE, *J. Pharm. Sci.*, **81**, 309 (1992)
10. M. THOMPSON, B. MERTENS AND M. KEISSER, *Analyst*, **118**, 235 (1993)

11. J.O. DE BEER, B.M.J. DE SPIEGELEER, J. HOOGMARTENS, I. SAMSON, D.L. MASSART AND M. MOORS, *Analyst* **117**, 933 (1992)
12. P.H. GOETSCH, CH. JUNGE AND W. KROENERT. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **69**, 401 (1986)
13. K.F. KARPINSKI, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **72**, 931 (1989)
14. Precision of Test Methods - Determination of Repeatability and Reproducibility for a Standard Test Methods by Inter Laboratory Test: ISO 5725. 1986, International Organization for Standardization, Geneva. International Organization for Standardization, in Accuracy (Trueness and Precision) of Measurement Methods and Results, ISO/DIS 5725-1 and 5725-3, 1990/91
15. "Vegetable and animal oils fats - Determination of Repeatability and Reproducibility of Methods of Analysis by Interlaboratory Tests", NEM 6303, 1986, Draft, Netherlands Standardization Institute. The Hague, Netherlands,
16. Appendix: Guidelines for collaborative study procedure validate characteristics of a method of analysis. Official Methods of Analysis, 1990. AOAC, Arlington, VA.
17. Guideline for submitting samples and analytical data for methods validation FDA, Center for Drugs and Biologics Department of Health and Human Services. February, 1987 Rockville, MD.
18. Comité de Elaboración de Guías Oficiales de Validación de la Dirección General de Control de Insumos para la Salud, SSA. "Validación métodos analíticos", 1991, México.
19. Validation of compendial methods. (1225) pp 1982-1984. The United States Pharmacopoeia XXIII, Ed. Pharmacopoeia Convection Inc. 1994, Washington, D.C.
20. J.C. MILLER, J.N. MILLER, "Estadística para química analítica", Ed. Addison - Wesley Iberoamericana, 1993, pp 87 - 110
21. W.W. DANIEL, "Bioestadística", Ed. Limusa, México, 1979, pp 243 -286
22. D.L. MAC TAGGART and S.O. FARWELL, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **75**, 594 (1992)
23. M.D. VAN ARENDONK and C.L. GRANT. *Anal. Chem.*, **53**, 2349 (1981)
24. W.J. YOUNDEN. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **45**, 169 (1962)
25. C. HARTMANN, D.L. MASSART and R.D. McDOWALL, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **12**, 1337 (1994)
26. D.L. MASSART, A. DIJKSTRA, L. KAUFMAN, "Evaluation and Optimization of Laboratory Methods", Ed Elsevier Scientific Publishing Company, New York, 1978 pp 39-124.