



**TERCER ENSAYO DE APTITUD INTERLABORATORIO ESQUEMA DE CONTROL
DE HPLC
ORGANIZADO POR CALIBA 2012
ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE RESULTADOS**

Coordinación general:

Dr. Horacio Denari – Coordinador Área Calidad
Ing. Mario Ismach – Coordinador Área Calidad

Evaluación estadística:

Msc. Ana Agulla
Lic. Olga Susana Filippini
Lic. Hugo Delfino

Docentes Disciplina de Estadística Universidad Nacional de Luján



INDICE

Metodología de Análisis	1
Información General	1
Objetivo	1
Los participantes recibirán:	1
Expresión de los resultados:	1
Estadística aplicada a módulos con resultados numéricos	1
Generalidades	1
Ensayo de homogeneidad.....	1
Glosario	2
Media y desvío estándar. Análisis Robusto.....	2
Z-Score	3
Detalles del procedimiento de análisis	3
Resultados	4
I. Analito a investigar	4
Analito: Concentración de cafeína en comprimidos analgésicos, empleando una técnica de H.P.L.C. en fase reversa.	4
Ensayo de homogeneidad.....	4
Estadística robusta.....	5
Intervalos de confianza	6
Gráfico de Youden	7



Metodología de Análisis

Información General

Objetivo

- Determinar un esquema de control para una perfecta performance de los cromatógrafos líquidos de alta resolución (HPLC). Para ello, se determinará la concentración de cafeína en comprimidos analgésicos, empleando una técnica de H.P.L.C. en fase reversa (CORRIDA ISOCRÁTICA EN COLUMNA C18 EN FASE MOVIL “DE RUTINA”, DETECTOR UV a 277 nm)

Los participantes recibirán:

- 1 vial con aproximadamente 2 gr. de muestra homogeneizada.
- 1 vial conteniendo 20 mg de estándar de cafeína de pureza conocida.

Expresión de los resultados:

- Los resultados deben expresarse en mg de cafeína por 100 mg de muestra.
- Valor teórico: 3,8 a 8,5 %
- El análisis debe efectuarse por duplicado (dos pesadas independientes de la muestra), informándose los resultados obtenidos y su promedio.

Método Propuesto:

Las condiciones cromatográficas sugeridas son las que se detallan a continuación:

- Columna C18
- Fase móvil
- Metanol: buffer 550:450
- Buffer: fosfato monobásico de potasio 0,01 M pH 2,5
- Flujo 1 mL/min
- Detector UV longitud de onda 277 nm
- Preparación de la muestra: pesar una cantidad determinada, diluir con buffer fosfato, sonicar por 30 minutos. Filtrar a través de una membrana de 0,45 µm.

Los participantes deberán describir las condiciones cromatográficas utilizadas en los campos correspondientes del formulario de resultados preestablecido, el cual será remitido vía mail al contacto técnico del laboratorio. Asimismo, deberán informar la Incertidumbre de Medición para el valor promedio obtenido para cada parámetro y las componentes de incertidumbre que se han tomado en cuenta.

Estadística aplicada a módulos con resultados numéricos

Generalidades

Luego de procesadas las muestras en los laboratorios, los resultados son cargados en la base de datos y procesados estadísticamente, calculando los parámetros indicados en el glosario siguiente:

Ensayo de homogeneidad

Para determinar la homogeneidad de la muestra se sigue el procedimiento indicado en “The International Harmonized Protocol for the Proficiency Testing of Analytical Chemistry Laboratories”. Thompson M., Ellison S., Wood R. Pure Appl. Chem., 78 (1), 145-196.” y en “Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparisons –ISO13528”.



Glosario

Esquema de control de calidad externo (CCE): sigla para programa de Control de Calidad Externo

Ensayo cuantificación de un grupo de muestras con un determinado análisis.

La mediana, que es por definición el valor cuya posición corresponde al 50% del número total de datos ordenados.

Media aritmética: Suma de todas las observaciones, sobre número total de datos.

Desvío o Sesgo: Desviación del resultado respecto del valor asignado

Desviación del resultado: Valor absoluto del desvío (ignorando el signo).

Precisión Cercanía entre medidas repetidas. Es una medida de reproducibilidad. La precisión, o generalmente imprecisión, se expresa continuamente como la variación del resultado realizado repetitivamente dentro de un ensayo, corrimiento, variación entre ensayos y variación entre laboratorios.

Variación entre ensayos Es un índice de la imprecisión que demuestra la variabilidad de los resultados de un ensayo de análisis a otro. Sólo podrá calcularse en el caso de repetición de las determinaciones en un mismo laboratorio, es decir, donde existieran no menos de 5 determinaciones para el mismo ensayo para cada laboratorio.

Variación entre laboratorios Es un índice de la imprecisión que expresa la variabilidad de resultados entre laboratorios que participan en el esquema CCE.

Parámetros estadísticos Media, desviación estándar (DE), coeficiente de variación (CV) y mediana son los parámetros que se utilizan en la evaluación de los resultados de CCE. La media (también llamada media aritmética o promedio), DE y CV son parámetros estadísticos utilizados cuando se asume que los datos tienen una distribución normal (Gaussiana). Dicha suposición no es requerida para calcular la mediana.

Valores atípicos. Muestra los cinco valores mayores y los cinco menores, con las etiquetas de caso.

Intervalos de confianza Los límites de confianza para detectar laboratorios que presenten valores fuera de rango. Los mismos se realizaron con un nivel de significación $(1-\alpha)$ igual al 99%.

La información correspondiente a cada parámetro de análisis será tratado como una población independiente de estudio.

Media y desvío estándar. Análisis Robusto

Este algoritmo retorna valores robustos de la media y la desviación estándar a los datos a los cuales se aplica.

NOTA 1. Robustez es una propiedad de la estimación del algoritmo, no del valor estimado que produce, entonces no es estrictamente correcto llamar a la media y desviación estándar calculados como tales a un algoritmo robusto. Sin embargo, para evitar el uso de terminología excesivamente engorrosa, el término “Media robusta” y “Desvío estándar robusto”, debe ser entendido en este Estándar Internacional como estimaciones de la media de la población o el desvío estándar de la población calculado usando un algoritmo robusto.

Sean los p ítems de los datos, ordenados de forma creciente, como:

$$x_1, x_2, x_3, \dots, x_p$$

Denomínese la media robusta y el desvío estándar robusto de estos datos como x^* y s^*

Calcule los valores iniciales de x^* y s^* como:

$$x^* = \text{mediana de } x_i \quad (i=1, 2, \dots, p)$$

$$s^* = 1,483 * \text{mediana de } |x_i - x^*| \quad (i=1, 2, \dots, p)$$

Actualizar los valores de x^* y s^* de la siguiente manera. Calcular:

$$\delta = 1,5s^*$$



Para cada x_i ($i=1,2, \dots, p$), calcular:

$$x_i = \begin{cases} x^* - \delta & \text{si } x_i < x^* - \delta \\ x^* + \delta & \text{si } x_i > x^* + \delta \\ x_i & \text{de lo contrario} \end{cases}$$

Calcular los nuevos valores de x^* y s^* :

$$x^* = \sum \frac{x_i}{p}$$
$$s^* = 1,134 \sqrt{\sum \frac{(x_i - x^*)^2}{(p-1)}}$$

Donde la sumatoria es sobre los i .

El estimador robusto x^* y s^* se deben derivar mediante un cálculo iterativo, actualizando los valores de x^* y s^* reiteradas veces usando los valores modificados, hasta que el proceso converja. La convergencia debe ser asumida cuando no hay cambios de una iteración hacia la otra en el tercer valor significativo del desvío estándar y de su figura equivalente en la media robusta.

Z-Score

La puntuación z es la medida del desvío de los resultados informados por cada laboratorio, respecto al valor asignado, expresado en unidades de desviación estándar. Este parámetro es conveniente por su cálculo directo y fácil interpretación. En este caso definimos una puntuación z para cada resultado analítico como el cociente entre el desvío respecto al valor asignado ($x_i - x^*$) dividido por la desviación estándar s^* .

Resultando: $z = (x_i - x^*) / s^*$

Dónde: x^* = Media robusta.

s^* = Desvío estándar robusto.

Detalles del procedimiento de análisis

Se comenzó con el proceso de estimación de la medidas robustas, para lo cual se introdujeron los valores iniciales y luego de manera iterativa se iba excluyendo los outliers y se recalculaban los valores de la media y desvío estándar a fines de obtener estadísticas robustas.

Se crearon intervalos de confianza dos y tres desviaciones estándar, aplicándose el criterio de medida cuestionable si el valor se encuentra entre los 2 y 3 desvíos e Insatisfactorio si es mayor a los 3 desvíos.

Para aquellos parámetros, donde la gran mayoría de los laboratorios reportan valores que son el límite de detección de la técnica o dispositivo empleado, no se pudo realizar un análisis paramétrico de los resultados. En este caso se hizo una descripción de los resultados obtenidos.

Los análisis estadísticos se realizaron sobre el promedio de las determinaciones hechas por cada laboratorio, debido a que no todos realizaron las dos mediciones.

Se calcularon los z -scores, como medida de estandarizar los valores obtenidos por los laboratorios y representarlos gráficamente para detectar los casos que se encuentran fuera de los límites de 2 y 3 desvíos estándar robustos.

Por último se procederá a mostrar el gráfico de Youden (se consideró un nivel α del 5%) para los analitos que cuentan con un número de resultados acordes a la realización del mismo, así como también de la puntuación z -score para cada uno de los laboratorios para mostrar gráficamente. Solamente se consideró un nivel α del 5%.

Resultados

I. Analito a investigar

Analito: Concentración de cafeína en comprimidos analgésicos, empleando una técnica de H.P.L.C. en fase reversa.

Ensayo de homogeneidad

Homogeneidad

Concentración de cafeína en comprimidos analgésicos, empleando una técnica de H.P.L.C. en fase reversa.

Sample t	value#1, $x_{t,1}$	value#2, $x_{t,2}$	sample average (B.4), $\bar{x}_t$	between-test-portion ranges (B.5), w_t
1	0.0539	0.0541	0.054	0.0002
2	0.0542	0.0544	0.0543	0.0002
3	0.0511	0.0570	0.05405	0.0059
4	0.0578	0.0569	0.05735	0.0009
5	0.0581	0.0523	0.0552	0.0058
6	0.0544	0.0546	0.0545	0.0002
7	0.0547	0.0549	0.0548	0.0002
8	0.0516	0.0575	0.05455	0.0059
9	0.0583	0.0574	0.05785	0.0009
10	0.0586	0.0528	0.0557	0.0058
11				
12				
13				
14				
15				
16				
17				
18				
19				
20				

number of samples g 10
 general average (B.6) 0.05523
 STD of sample averages 0.001355278
 within-samples STD (B.8) 0.002633249
 between-samples STD (B.9) 0

Homogeneity check

(Intern. Harmonized Protocol Appendix 1)

D=a-b	S=a+b	D ² =(a-b) ²	(S _t - $\bar{S}$) ²	Sample t
-0.0002	0.108	4E-08	6.0516E-06	1
-0.0002	0.1086	4E-08	3.4596E-06	2
-0.0059	0.1081	0.0003481	5.5696E-06	3
0.0009	0.1147	8.1E-07	1.7978E-05	4
0.0058	0.1104	0.0003364	3.6E-09	5
-0.0002	0.109	4E-08	2.1316E-06	6
-0.0002	0.1096	4E-08	7.396E-07	7
-0.0059	0.1091	0.0003481	1.8496E-06	8
0.0009	0.1157	8.1E-07	2.7458E-05	9
0.0058	0.1114	0.0003364	8.836E-07	10
				11
				12
				13
				14
				15
				16
				17
				18
				19
				20

number of samples 10

Cochran test procedure for duplicate results

D_{max}^2 0.00003481
 S_{DD} 0.00013868
 C 0.25100952
 critical value (99%) 0.718 no outlying pair
 critical value (95%) 0.602 no outlying pair

Test for significant inhomogeneity

S_{an}^2 6.934E-06
 0.11046
 V_S 7.3471E-06
 S_{sam}^2 0

Expected standard deviation for proficiency assessment 0.0082845

Allowable sampling variance 6.177E-06 critical F₁ 1.88
 critical value 1.8616E-05 critical F₂ 1.01

Homogeneity OK

Homogeneity ok

Concentración de cafeína en comprimidos analgésicos, empleando una técnica de H.P.L.C. en fase reversa.

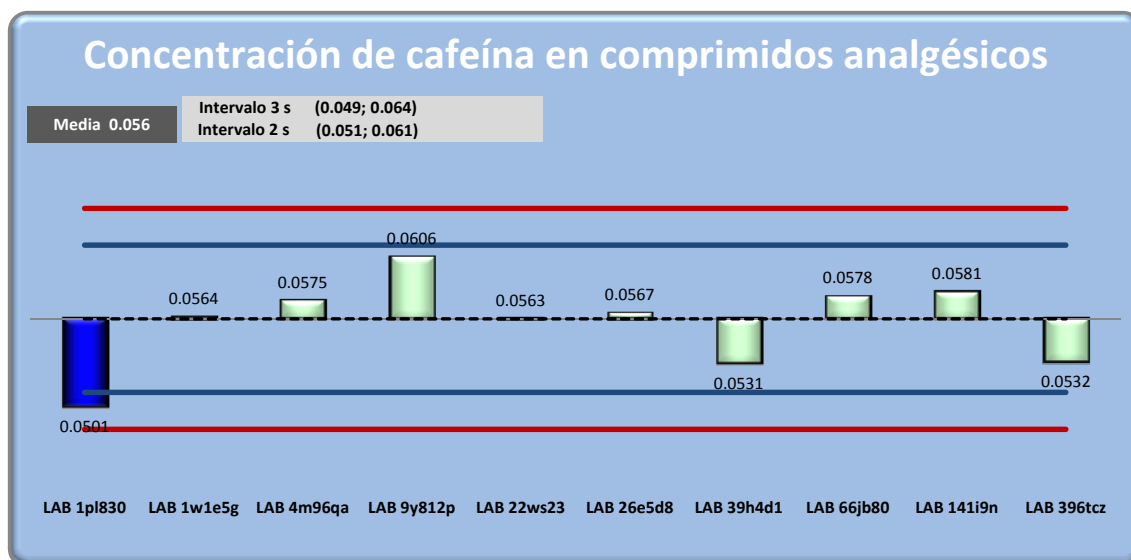
Estadística robusta

Participantes: 10 de 10 laboratorios.

Concentración de cafeína en comprimidos analgésicos, empleando una técnica de H.P.L.C. en fase reversa.			Iteración										
			$ *x-x $	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
LAB 1p1830	0.0501	0.0065	0.0533	0.0533	0.0533	0.0533	0.0533	0.0533	0.0533	0.0533	0.0533	0.0533	
LAB 1w1e5g	0.0564	0.0002	0.0564	0.0564	0.0564	0.0564	0.0564	0.0564	0.0564	0.0564	0.0564	0.0564	
LAB 4m96qa	0.0575	0.0010	0.0575	0.0575	0.0575	0.0575	0.0575	0.0575	0.0575	0.0575	0.0575	0.0575	
LAB 9y812p	0.0606	0.0041	0.0597	0.0597	0.0597	0.0597	0.0597	0.0597	0.0597	0.0597	0.0597	0.0597	
LAB 22ws23	0.0563	0.0003	0.0563	0.0563	0.0563	0.0563	0.0563	0.0563	0.0563	0.0563	0.0563	0.0563	
LAB 26e5d8	0.0567	0.0002	0.0567	0.0567	0.0567	0.0567	0.0567	0.0567	0.0567	0.0567	0.0567	0.0567	
LAB 39h4d1	0.0531	0.0034	0.0533	0.0533	0.0533	0.0533	0.0533	0.0533	0.0533	0.0533	0.0533	0.0533	
LAB 66jb80	0.0578	0.0013	0.0578	0.0578	0.0578	0.0578	0.0578	0.0578	0.0578	0.0578	0.0578	0.0578	
LAB 141i9n	0.0581	0.0016	0.0581	0.0581	0.0581	0.0581	0.0581	0.0581	0.0581	0.0581	0.0581	0.0581	
LAB 396tcz	0.0532	0.0033	0.0533	0.0533	0.0533	0.0533	0.0533	0.0533	0.0533	0.0533	0.0533	0.0533	
X*	0.0565	0.0015	0.0562	0.0562	0.0562	0.0562	0.0562	0.0562	0.0562	0.0562	0.0562	0.0562	
Desvío Estándar	0.0030	0.0021	0.0023	0.0023	0.0023	0.0023	0.0023	0.0023	0.0023	0.0023	0.0023	0.0023	
S*	0.0022		0.0026	0.0026	0.0026	0.0026	0.0026	0.0026	0.0026	0.0026	0.0026	0.0026	
d	0.0032		0.0039	0.0039	0.0039	0.0039	0.0039	0.0039	0.0039	0.0039	0.0039	0.0039	
x - d	0.0533		0.0524	0.0524	0.0524	0.0524	0.0524	0.0524	0.0524	0.0524	0.0524	0.0524	
x + d	0.0597		0.0601	0.0601	0.0601	0.0601	0.0601	0.0601	0.0601	0.0601	0.0601	0.0601	

Luego de la primera iteración se observa que los valores extremos se transforman en los límites $x - \delta$ y $x + \delta$ correspondiente a cada iteración, así se llega a una estimación robusta de los estadísticos que luego serán utilizados en los intervalos de confianza y los cálculos de los z-score.

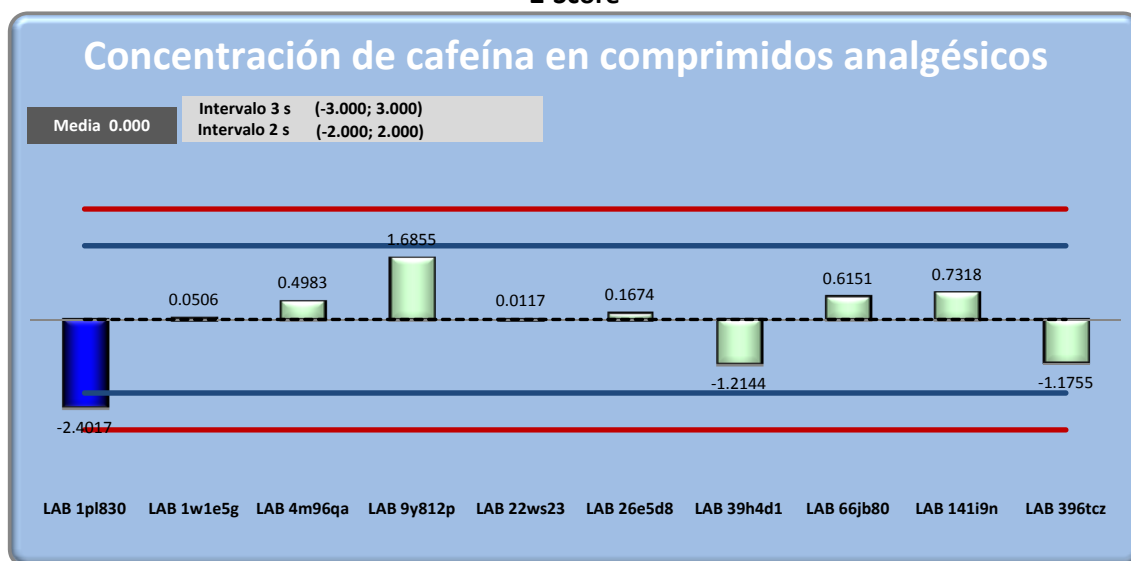
Intervalos de confianza



Laboratorios Cuestionables (0,051; 0,061) = Laboratorio 1pl830

Laboratorios Insatisfactorios (0,049; 0,064) = Ninguno.

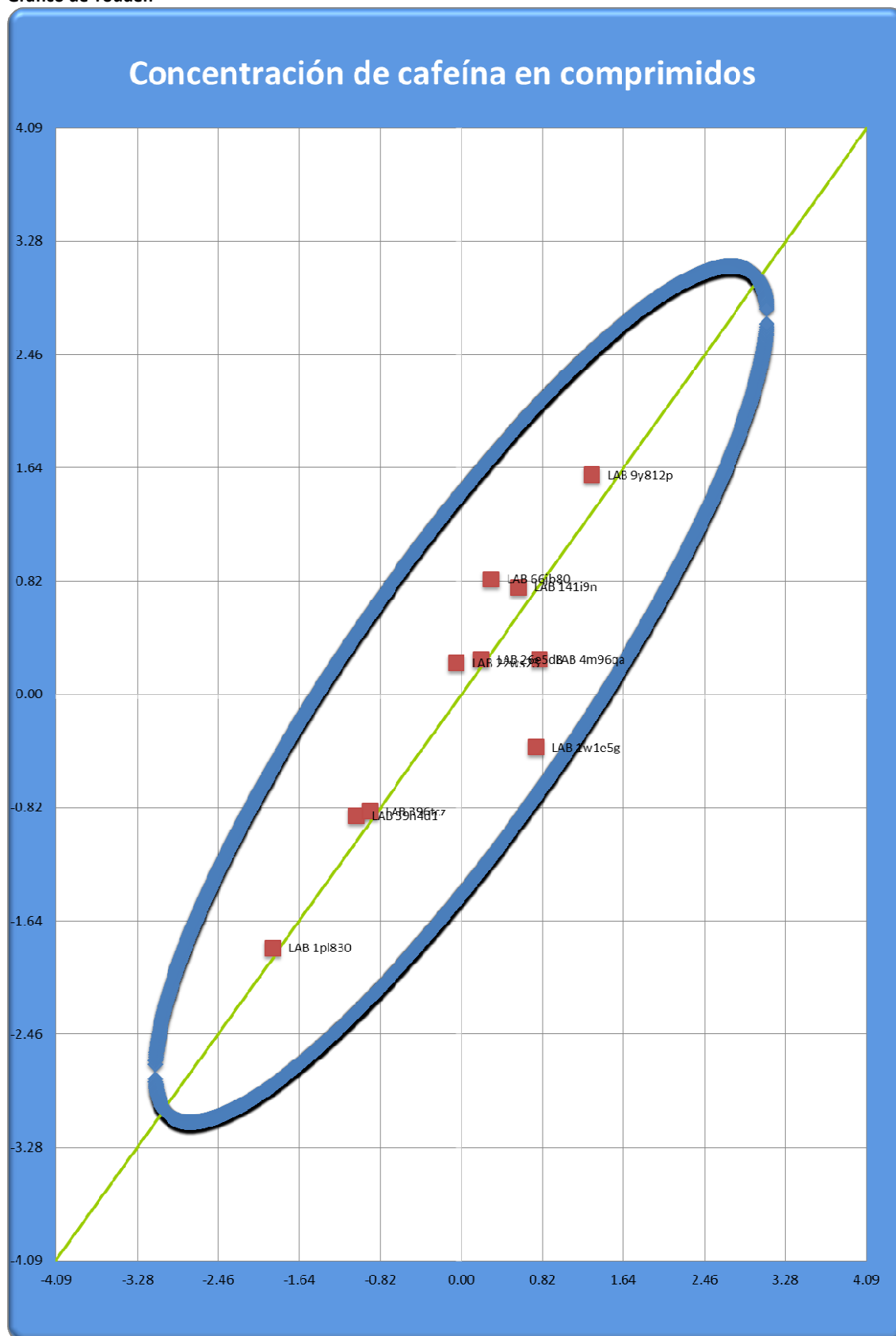
Z-Score



Laboratorios Cuestionables $\pm 2\sigma$ = Laboratorio 1pl830.

Laboratorios Insatisfactorios $\pm 3\sigma$ = Ninguno.

Gráfico de Youden



Todos los laboratorios están dentro de la elipse de confianza.