



Evaluación y selección de modelo matemático a utilizar en la curva de calibración para la validación de métodos bioanalíticos por cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas tándem LC-MS/MS.

Christian Tadeo badillo-Castañeda^a, Sandra Lucia Montoya-Eguía^a, Luis Ángel Contreras-Sánchez^a, Lourdes Garza-Ocañas^a, Marco Antonio Cedillo-Ramírez^a

Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Medicina, Departamento de Farmacología y Toxicología

Palabras clave

análisis mínimos cuadrados, modelo matemático, método bioanalítico, coeficiente de correlación, coeficiente de determinación

*Autor de
Correspondencia
correo@christianbadillo.com

Resumen

Objetivo: Evaluar las pruebas estadísticas utilizadas para la selección de un modelo matemático a utilizar en la selección de la curva de calibración de métodos bioanalíticos por LC-MS/MS.

Resultados: Se procesaron curvas de calibración multi-analito (loratadina, tramadol, dexketoprofeno e ibuprofeno) en plasma humano por triplicado con diez niveles de diferentes de calibración cada una. La técnica de procesamiento de muestra fue precipitación de proteínas.

Discusión: El parámetro, suma de cuadrados, fue el de mayor utilidad para la selección del modelo matemático, y los modelos con menor error de concentración calculada fueron los ponderados, en sus modelos tanto lineales como cuadráticos. Los coeficientes de correlación, y determinación no se relacionaron con los mejores modelos matemáticos.

Conclusión: Para un método bioanalítico se debe considerar el modelo matemático con ponderación $1/x^2$ y no es recomendable la utilización de los coeficientes de correlación o determinación como criterios de aceptación.

Evaluation and selection of a mathematical model to be used in the calibration curve for the validation of bioanalytical methods by liquid chromatography coupled to LC-MS / MS tandem mass spectrometry.

Recibido

14 julio 2020

Aceptado

7 diciembre 2020

Abstract

Objective: Evaluate the statistical tests used to choose the mathematical model to be used in the selection of the calibration curve for bioanalytical methods by LC-MS / MS.

Results:

Multi-analyte calibration curves (loratadine, tramadol, dexketoprofen, and ibuprofen) were processed in triplicate with ten different calibration levels each. The technique used in the processing of the samples was protein precipitation.

Discussion:

The parameter, sum of squares, was the most useful for the selection of the mathematical model. Weighted models, both linear and quadratic, obtained the lowest calculated concentration error.

No relationship was found between the correlation and determination coefficients and the best mathematical models obtained.

Conclusion:

For a bioanalytical method, the weighted mathematical model 1/x² must be considered, nevertheless, it is not recommended to use the correlation and / or determination coefficients as acceptance criteria.

Introducción

La aplicación de los métodos bioanalíticos consiste en la determinación de la concentración de un analito en matriz biológica, para lo anterior, es necesario la validación del método analítico y el cumplimiento de los criterios de aceptación para garantizar que el método cumple con el propósito para el que fue diseñado. Uno de los parámetros de validación o criterios de desempeño es el modelo matemático de la curva de calibración con el cual se determina la concentración del analito en la matriz. Un error común en los procesos de calibración es el uso de los coeficientes de determinación o correlación como prueba de linealidad, negar la heterocedasticidad de los datos y la no selección de un factor adecuado de ponderación.¹ En los métodos analíticos de intervalos de trabajo estrechos, los datos experimental presentan una varianza constante (homocedasticidad), sin embargo, en los métodos bioanalíticos para estudios farmacocinéticos es requisito la cuantificación del 5% de la concentración máxima ($C_{m\acute{a}x}$),^{2,3} lo anterior conlleva a diseños de métodos con intervalos de concentraciones muy amplios, en los cuales la varianza de los datos no es constante, la mayor varianza presente a altas concentraciones influye más que la pequeña variación obtenida a niveles bajos de concentración, por lo tanto, la

precisión y la exactitud están comprometidas, se obtienen por lo tanto errores superiores al criterio de aceptación establecido en guías bioanalíticas. Por lo que se debe emplear un modelo matemático que proporcione la mejor predicción entre la relación variable dependiente (y) que la conocemos como respuesta, con la variable independiente (x) llamada concentración. Para corregir lo anterior, se sugiere un modelo de calibración ponderado⁴. Esto no es un método de manipulación de datos para hacerlos parecer más aceptables, sino que es el método correctamente estadístico para el tratamiento de datos heterocedásticos⁵.

La correcta elección de un modelo del factor de ponderación a utilizar se puede seleccionar a través de diferentes formas, una de las más sencillas es de acuerdo con el porcentaje de error de la concentración calculada con la ecuación de la recta con el factor de ponderación con respecto a la concentración nominal. Otras formas, es a través de la media cuadrática del error del análisis de varianza y también el criterio de información de Akaike corregido (AICc), aunque este criterio es utilizado raramente en química analítica, es una medida de la calidad relativa de un modelo estadístico, para un conjunto dado de datos, es de alta utilidad en la selección de un modelo matemático⁶. La prueba falta de ajuste, llamada también Lack-of-fit test (LOF) o falta de ajuste, es una prueba estadística derivada del análisis de varianza aplicado a la regresión. Esta prueba se basa en la comparación de la variabilidad de un conjunto de mediciones de calibración y es relativamente simple. Específicamente, se puede dividir en dos componentes: 1) error prueba o error experimental aleatorio, correspondiente a la variabilidad de las réplicas en torno a sus medios comunes; 2) falta de ajuste, que es la variabilidad del grupo significa alrededor de la línea de regresión. En este caso, la hipótesis nula significa que no hay una falta de ajuste significativa presente, si el valor p es mayor que α , usted no puede concluir que el modelo no se ajusta adecuadamente a los datos.

El propósito del presente trabajo es evaluar mediante análisis estadístico diferentes modelos matemáticos y las herramientas de selección a utilizar para los métodos bioanalíticos de cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas en tándem.

Material y métodos

Clorhidrato de tramadol marca European Pharmacopeia, Dexketoprofeno marca USP, Ibuprofeno marca USP, Loratadina marca USP, ácido fórmico grado ACS marca Fermont, formato de amonio marca SigmaAldrich.

Condiciones instrumentales. Para la separación cromatográfica se empleó un cromatógrafo de líquidos Agilent Technologies modelo

1260 con una columna C18 (3.0 x 150 mm, 3.5 μ m) a 30°C. La fase móvil consistió en acetonitrilo: formato de amonio (0.01M) a pH 3.0 (30/70 %v/v) a un flujo de 0.7 mL/min. El volumen de inyección fue de 6 microlitros con una temperatura en el automuestreador de 12°C. El tiempo total de análisis fue de 3.0 minutos. Para el análisis instrumental se utilizó un espectrómetro de masas en tándem marca Agilent Technologies modelo G6410B. Se utilizó una fuente de ionización por electrospray operada en modo de ionización positiva a 300°C, 11 L/min y 45 psi, El voltaje del capilar fue de 1200 V. Las condiciones de adquisición para cada analito se muestran en la tabla 1.

Tabla 1.

Analito	Ion precursor	Ion producto	Voltaje del fragmentador	Energía colisión
Loratadina	383.3	337.2	122	26
Tramadol	264.3	58.1	104	15
Dexketoprofen	255.1	209.1	140	14
Ibuprofeno	224.3	161.1	66	14

Condiciones de adquisición en el espectrómetro de masas.

Preparación de curvas de calibración.

A partir de la sustancia de referencia se prepararon soluciones stock en metanol, y se procedió a preparar la curva de calibración en un pool de plasma humano compuesto por 18 plasmas individuales, al añadir el diluyente en ningún caso se excedió del 5% en apego a la norma oficial mexicana NOM-177-SSA1-2013. Las concentraciones fueron 0.65, 1.30, 2.60, 5.21, 10.42, 20.83, 41.67, 62.50, 83.33, 111.11 ng/mL para loratadina, 2.90, 5.80, 11.61, 23.21, 46.43, 92.86, 185.71, 371.43, 278.57, 371.43, 495.24 ng/mL para Tramadol, 44.64, 89.29, 178.57, 357.14, 714.29, 1,428.57, 2,857.14, 4,285.71, 5,714.29, 7,619.05 ng/mL para dexketoprofeno, 297.62, 595.24, 1,190.48, 2,380.95, 4,761.90, 9,523.81, 19,047.62, 28,571.43, 38,095.24, 50,793.65 ng/mL.

Procesamiento de la muestra,

El tratamiento de la muestra consistió en una precipitación de proteínas con 0.5 mL de acetonitrilo que se añadió a 0.1 mL plasma humano. El tubo fue agitado en vortex por 9 minutos y posteriormente centrifugado a 12,500 rpm por 10 minutos. El sobrenadante fue transferido a un vial de con inserto de fondo plano

para su inyección en el equipo cromatográfico. En la figura 1, se muestra un cromatograma representativo del método.

Figura 1

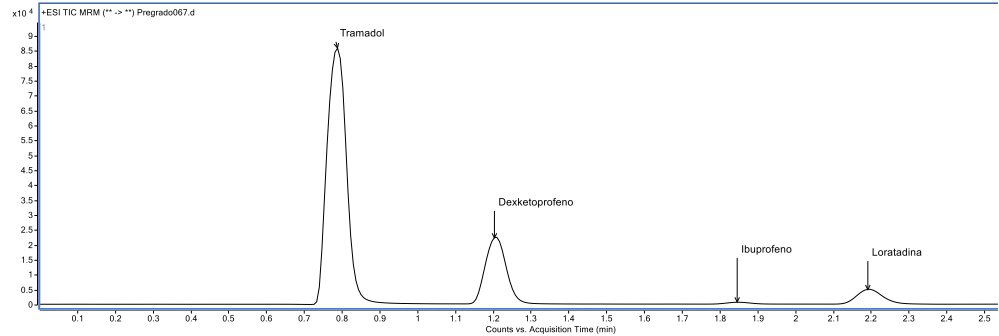


Figura 1a Cromatograma del ion total para la inyección de una muestra. En ella se observa que el ibuprofeno es un analito con poca ionización.

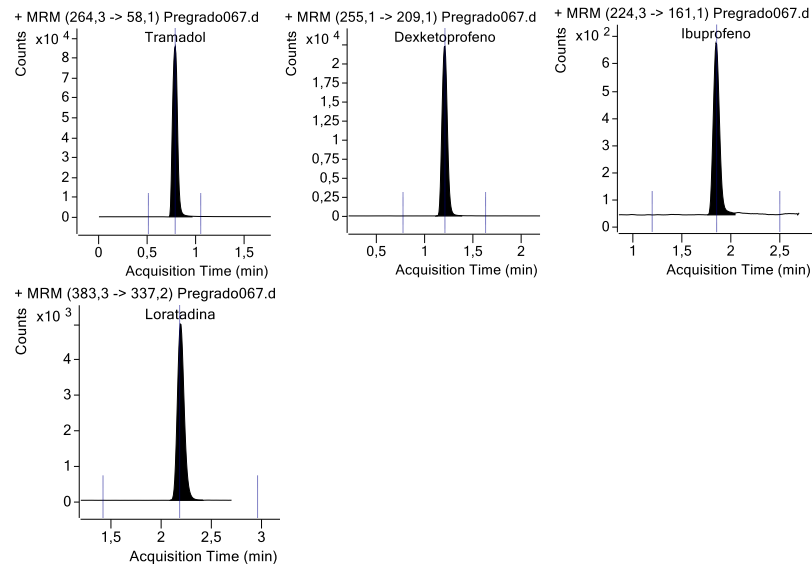


Figura 1b, cromatograma de monitoreo de reacción múltiple para cada uno de los analitos indicando ion precursor y ion producto.

Análisis de datos y estadístico

La adquisición de datos del sistema cromatográfico líquidos masas, se realizó con el programa MassHunter Adquisición B.09, para el análisis de los datos crudos se utilizó el programa MassHunter Quantitative Analysis 10.0. El análisis estadístico de los modelos matemáticos fue realizado con el paquete Minitab v19.0 y R 3.6.1. Para la evaluación de los modelos matemáticos se emplearon los criterios de aceptación de la NOM-177-SSA1-2013, la Guía de

Validación de Métodos Bioanalíticos de la Agencia Europea del Medicamento y la guía para la industria de validación de métodos bioanalíticos de la FDA⁷ Para lo anterior se evaluaron tres curvas de calibración sin replicado, los datos de concentración recuperada de la curva de calibración deben estar dentro del 15% de la concentración nominal en cada nivel de concentración, excepto para el límite inferior de cuantificación, ya que puede ser menor o igual que el 20%. Al menos el 75% de las concentraciones de la curva de calibración con un mínimo de 6 puntos deben cumplir con este criterio, del total de las curvas evaluadas, al menos el 50% de cada nivel de concentración debe cumplir con el criterio del 15% de la concentración nominal y 20% para el límite inferior de cuantificación.

Resultados y discusión.

En este trabajo no se incluyeron herramientas visuales para la selección de la curva de calibración, entre ellas podemos citar, la gráfica de residuales, la curva de calibración, o la prueba de sensibilidad, ciertas de ellas, a pesar de ser ampliamente utilizadas, carecen de una prueba estadística necesaria para su correcta interpretación. La gráfica de la curva de calibración con un intervalo de calibración muy amplio carece de utilidad cuando la desviación se presenta a niveles bajos de la curva de calibración, por lo que su utilidad prácticamente radica cuando la desviación se presenta a niveles altos o para determinar si el modelo se ajusta más a un modelo cuadrático que a un modelo lineal. La prueba de sensibilidad es la de mayor utilidad consiste en graficar los factores de respuestas, se permite una desviación de $\pm 5\%$, esta prueba no está listada en ninguna de las guías de los métodos bioanalíticos, más información se puede encontrar en IUPAC⁸.

En la figura 2, Se observa la gráfica de la varianza de la respuesta de los datos para los cuatro analitos estudiados. Dado que la varianza no es constante, se puede deducir que hay un fenómeno de heterocedasticidad, por lo que se sugiere la utilización de regresión por mínimos cuadrados ponderados.

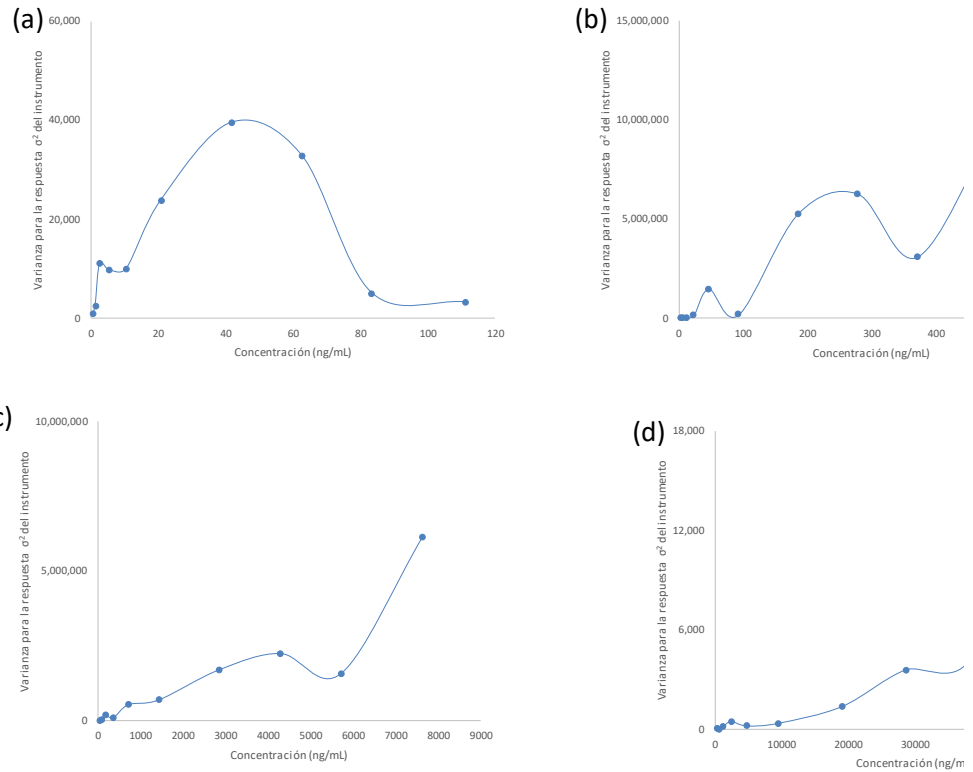


Figura 2. Gráfica de la varianza de la respuesta a lo largo del intervalo de trabajo de la curva de calibración para los cuatro analitos: a) Loratadina, b) Tramadol, c) Dexketoprofeno, d) Ibuprofeno

Los modelos con menor error fueron los modelos con ponderación $1/x^2$ ya sea el modelo lineal, o el modelo cuadrático ver figura 3. Aunque es posible usar modelos cuadráticos en las curvas de calibración en métodos bioanalíticos, ⁹⁻¹¹ desde el punto de vista regulatorio para estudios de biodisponibilidad o bioequivalencia las agencias los han desaconsejado en favor de los métodos lineales por ser más sencillos. 12-15

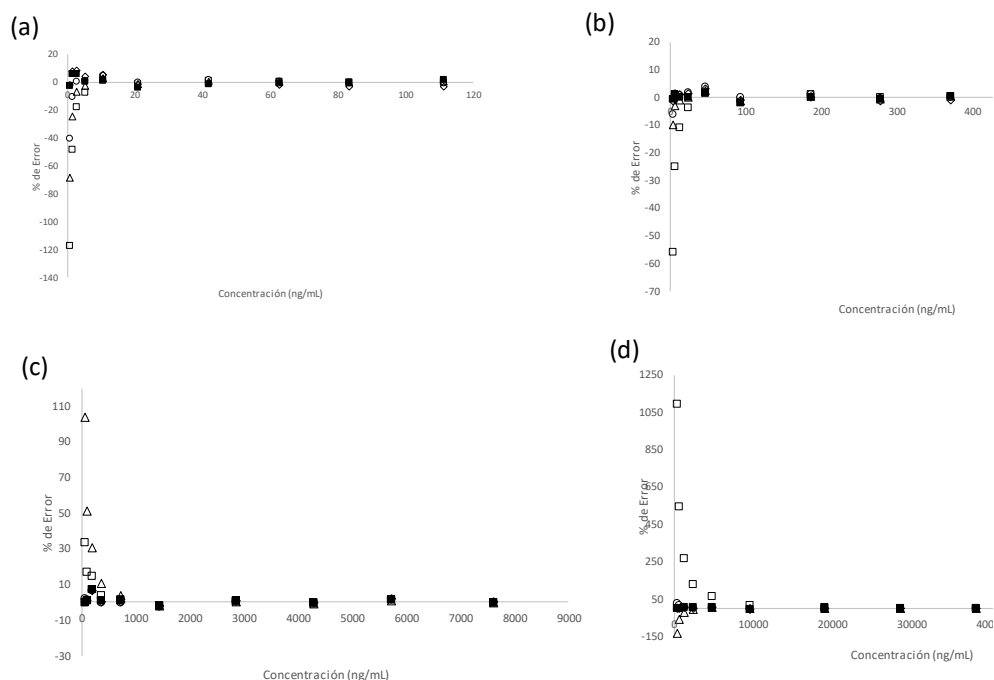


Figura 3. Porcentaje de error promedio para nivel de la curva de calibración de los diferentes modelos matemáticos: a) Loratadina, b) Tramadol, c) Dexketoprofeno, d) Ibuprofeno; cuadrado sin relleno (modelo lineal sin ponderación) círculo sin relleno (modelo lineal con ponderación $1/x$), rombo sin relleno (modelo con ponderación $1/x^2$), triángulo sin relleno (modelo cuadrático sin ponderación), cuadrado con relleno (modelo cuadrático con ponderación $1/x^2$).

Con respecto a la falta de ajuste, el modelo de regresión exhibe falta de ajuste cuando no describe adecuadamente la relación funcional entre los factores experimentales y la variable de respuesta. La mayoría de los modelos presentaron buen ajuste, con excepción de ibuprofeno en su modelo lineal sin ponderar, o lineal ponderado $1/x$ y tramadol ponderado $1/x$ y $1/x^2$. En el caso de los modelos cuadráticos tanto sin ponderar como ponderados no fue posible rechazar la falta de ajuste, por lo que se puede concluir que el modelo tiene un ajuste adecuado.

En referencia a la suma de los cuadrados, medida que ayuda a expresar la variación atribuida a la relación entre la concentración del analito y la respuesta del instrumento, los modelos con ponderación $1/x^2$ son los que expresaron menor suma de cuadrados, en contraste con los modelos sin ponderar que mostraron mayor suma de cuadrados. El modelo matemático con menor suma de cuadrados se relacionó con un mayor cumplimiento de criterios de aceptación de la curva de calibración mencionados en la NOM-177-SSA1-2013, por ejemplo, en los modelos con ponderación $1/x^2$, las tres curvas de calibración cumplieron el criterio de al menos el 75% de las

concentraciones de la curva de calibración estuvieron dentro del 15% de la concentración nominal en cada nivel de concentración, excepto para el límite inferior de cuantificación, ya que puede ser menor o igual que el 20%. Caso similar sucedió con el criterio de al menos el 50% de cada nivel de concentración debe cumplir con el criterio del 15% de la concentración nominal y 20% para el límite inferior de cuantificación. Ver tabla 2.

Tabla 2. Comparación de modelos, con los diferentes parámetros.

Analito	Modelo	Suma de cuadrados	Falta de ajuste	R2	AICc	Curvas que cumplen con criterio	Niveles que cumplen con criterio.
Loratadina	Lineal	1.92E+09	0.053	0.99970	386.3	2	8
	Lineal 1/X	4.11E+07	0.071	0.9988	388.71	3	10
	Lineal 1/X2	8.58E+05	0.549	0.9822	428.54	3	10
	Cuadrático	1.92E+09	0.296	0.9998	380.04	2	8
	Cuadrático 1/X2	8.60E+05	0.849	0.9835	426.68	3	10
Tramadol	Lineal	3.14E+11	0.209	0.9997	537.66	2	8
	Lineal 1/X	1.53E+09	0.026	0.9996	504.76	3	10
	Lineal 1/X2	7.54E+06	0.022	0.9989	499.46	3	10
	Cuadrático	3.14E+11	0.650	0.9998	532.82	3	10
	Cuadrático 1/X2	7.54E+06	0.290	0.9993	489.83	3	10
Dexketoprofeno	Lineal	2.65E+10	0.803	0.9988	489.17	1	6
	Lineal 1/X	8.56E+05	0.800	0.9986	472.77	3	10
	Lineal 1/X2	2.82E+03	0.912	0.9909	489.17	3	10
	Cuadrático	2.65E+10	0.725	0.9988	511.12	2	8
	Cuadrático 1/X2	2.82E+03	0.863	0.9906	491.81	3	10
Ibuprofeno	Lineal	2.90E+07	0.003	0.99480	347.05	0	5
	Lineal 1/X	1.48E+03	0.002	0.9958	302.34	3	10
	Lineal 1/X2	7.50E-02	0.506	0.9988	293.16	3	10
	Cuadrático	2.91E+07	0.899	0.9978	322.31	1	7
	Cuadrático 1/X2	7.51E-02	0.448	0.9986	295.41	3	10

A diferencia de la regresión lineal y no lineal de mínimos cuadrados, la regresión ponderada de mínimos cuadrados no está asociada con un tipo particular de función utilizada para describir la relación entre las variables. En cambio, los mínimos cuadrados ponderados reflejan el comportamiento de los errores aleatorios en el modelo; y se puede usar con funciones que son lineales o no lineales en los parámetros. Funciona incorporando constantes no negativas adicionales, o pesos, asociados con cada punto de datos, en el criterio de ajuste. El tamaño del peso indica la precisión de la información contenida en la observación asociada. La optimización del criterio de ajuste ponderado para encontrar las estimaciones de los parámetros permite

que los pesos determinen la contribución de cada observación a las estimaciones finales de los parámetros. Es importante tener en cuenta que el peso de cada observación se da en relación con los pesos de las otras observaciones; por lo que diferentes conjuntos de pesos absolutos pueden tener efectos idénticos.

Los mínimos cuadrados ponderados son un método eficiente que hace buen uso de pequeños conjuntos de datos, la principal ventaja que disfrutan los mínimos cuadrados ponderados sobre otros métodos es la capacidad de manejar situaciones de regresión en las que los puntos de datos son de calidad variable. Si la desviación estándar de los errores aleatorios en los datos no es constante en todos los niveles de las variables explicativas, el uso de mínimos cuadrados ponderados en cada nivel de las variables explicativas produce las estimaciones de parámetros más precisas posibles. En este trabajo, los métodos con ponderación $1/x$ son los que presentaron menor error de concentración calculada, por lo que este tipo de modelos es gran utilidad en métodos analíticos de rango amplio.

Con respecto a los coeficientes de correlación (r), y determinación (R^2), la NOM-177-SSA1-2013 no establece un criterio de aceptación para métodos bioanalíticos, como si lo hace para perfil de disolución donde el coeficiente de correlación debe ser mayor a 0.99. El mismo caso de no tener un criterio de aceptación para de la curva de calibración sucede en las guías de la FDA y la agencia europea del medicamento (EMA).

En este trabajo no se observó una relación lineal entre los coeficientes de correlación y determinación con el criterio de aceptación porcentaje de error para cada punto de la curva de calibración (concentración adicionada vs concentración calculada) descritos en la NOM, por lo que un mayor valor de R^2 no indica un mayor cumplimiento de porcentaje de error, por lo anterior, debe desaconsejarse el utilizar estos criterios como prueba de bondad de ajuste para la selección de un modelo matemático. El criterio de información de Akaike corregido (AICc) ha sido sugerido como una utilidad para la selección de un modelo de calibración, en la comparación de modelos se prefiere el modelo con menor valor. En este trabajo sólo en algunos casos pudo comprobarse que un menor valor de AIC indicara un menor error en los errores de la curva de calibración, ver Tabla 2.¹⁶⁻¹⁷

Conclusiones

Los modelos matemáticos resultaron ser diferentes entre sí, los modelos que mejor describen la relación concentración respuesta para un método analítico y presentan menor error son los modelos con ponderación $1/x^2$, ya sea lineales o cuadráticos. Un menor valor de suma de cuadrados resultó ser la mejor herramienta para la selección de un modelo matemático.

Referencias:

1. Raposo F. Evaluation of analytical calibration based on least-squares linear regression for instrumental techniques: A tutorial review. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2016;77:167-185.
2. EMA. Guideline on bioanalytical method validation. In: Agency EM, ed2011.
3. Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013. In:2013.
4. Gu H, Liu G, Wang J, Aubry AF, Arnold ME. *Anal Chem*. 2014;86(18):8959-8966.
5. Flanagan RJ, Taylor AA, Watson ID, Whelpton R. Basic Laboratory Operations. In: *Fundamentals of Analytical Toxicology*. Great Britain: John Wiley & Sons Ltd; 2007:353-398.
6. Rozet E, Ziemons E, Marini RD, Hubert P. *Analytical Chemistry*. 2013;85(13):6327-6335.
7. FDA. Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry. In:2018.
8. Ettre L. *Pure Appl Chem*. 1993;65(4):819-872.
9. Vlase L, Imre S, Muntean D, Leucuta SE. *J pharmaceut biomed*. 2007;44(3):652-657.
10. Xue YJ, Liu J, Unger S. *J pharmaceut biomed*. 2006;41(3):979-988.
11. Kingbäck M, Josefsson M, Karlsson L, et al. *J pharmaceut biomed*. 2010;53(3):583-590.
12. Li W, Zhang J, Tse FLS. *Handbook of LC-MS Bioanalysis: Best Practices, Experimental Protocols, and Regulations*. Wiley; 2013.
13. Singtoroj T, Tarning J, Annerberg A, et al. *J pharmaceut biomed*. 2006;41(1):219-227.
14. Sonawane SS, Chhajed SS, Attar SS, Kshirsagar SJ. *J Anal Sci and Technol*. 2019;10(1):1.
15. Yuan L, Zhang D, Jemal M, Aubry A-F. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2012;26(12):1465-1474.
16. Cherkassky V, Ma Y. *Neural Comput*. 2003;15(7):1691-714.
17. Kirkup L, Mulholland M. *J chromatogr A*. 2004;1029(1-2):1-11.