

# Validación de métodos analíticos

*Fuentes: The Fitness for Purpose of Analytical Methods. A laboratory guide to method validation and related topics. Eurachem Guide, 1998 y Guía para la validación de métodos de ensayo. OAA.DC-LE-05*



**INSTITUTO ARGENTINO  
DE NORMALIZACIÓN  
Y CERTIFICACIÓN**

# Principios de la práctica analítica

1. Las mediciones analíticas se deberían hacer para satisfacer una necesidad acordada (por ej, algún objetivo definido)
2. **Las mediciones analíticas se deberían realizar usando métodos y equipamiento que han sido probados para asegurar que se ajustan al propósito de la medición**
3. El personal dedicado a las mediciones analíticas debería ser calificado y competente para realizar la tarea (y demostrar que pueden realizar el análisis correctamente)
4. Debería haber un ensayo independiente regular del desempeño técnico de un laboratorio
5. Las mediciones analíticas realizadas en un lugar deberían ser consistentes con aquellas realizadas en otro lugar
6. Las organizaciones que hacen mediciones analíticas deberían tener procedimientos de control de calidad y de aseguramiento de la calidad bien definidos

# Introducción

La validación de un método es un requisito importante en la práctica de los análisis químicos. Sin embargo, se suele considerar a la validación de un método como algo que solamente se puede hacer en colaboración con otros laboratorios y en consecuencia, no se hace.

- ▶ Esta guía apunta a los laboratorios que necesitan validar métodos y que no tienen la posibilidad inmediata de participar en ensayos colaborativos

# **¿Qué es validación de un método?**

**Validación es la confirmación mediante el suministro de evidencia objetiva de que se han cumplido los requisitos para una utilización o aplicación específica prevista (IRAM 32)**

# Es el proceso de definir un requisito analítico y de confirmar que el método en consideración es apto para lo que requiere la aplicación

- ✓ Está implícito que los estudios para determinar los parámetros de aptitud del método se hacen
  - ✓ usando **equipamiento** que funciona y que está calibrado correctamente (“*within specification*”)
  - ✓ El **operador** es competente en ese campo de trabajo y tiene el conocimiento suficiente tal que es capaz de tomar decisiones apropiadas a partir de las observaciones que surgen a medida que avanza el estudio
- ✓ Muchos de los parámetros de la aptitud del método que se asocian con la validación son de hecho evaluados, por lo menos aproximadamente, como parte del desarrollo del método
  - ✓ Muy frecuentemente no es posible determinar exactamente dónde termina el desarrollo de un método y dónde comienza la validación de ese método

# ¿Por qué es necesario validar un método?

1. Cuando la medición analítica es importante (costo, salud, remediación, legal, etc.)
  1. Virtualmente, cualquier aspecto de la sociedad se respalda de algún modo por una medición analítica
  2. Es importante determinar el resultado correcto y ser capaz de demostrar que es correcto
2. Por la obligación profesional del analista
  1. El cliente espera **confiar** en los resultados informados y generalmente los cuestiona cuando aparece algún conflicto (aquí el analista debe demostrar que ha informado la respuesta correcta para la parte analítica del problema del cliente → la validación del método permite demostrar que “el método “is fit for purpose”
  2. Por la confianza con que el cliente necesita **tomar decisiones** en base a los resultados analíticos → aquí se debe validar la aptitud del método y estimar la incertidumbre del resultado de un modo que sea ampliamente reconocido, internamente consistente y fácil de interpretar. (Mucha de la información requerida para evaluar la incertidumbre se puede obtener durante la validación del método)
  3. La **toma de muestras**: si el laboratorio no puede tomar la muestra o no tiene influencia sobre ello, los resultados deben informarse sobre la base de las muestras como fueron recibidas y destacar este hecho en el informe

# ¿Cuándo debería validarse un método?

Cuando se necesita verificar que sus parámetros de aptitud son adecuados para usar para un problema analítico particular. Ejemplos:

- Cuando se desarrolla un método nuevo
- Cuando se revisa un método ya establecido para mejorar o extender a un nuevo problema
- Cuando el control de calidad indica que el método en uso está cambiando con el tiempo
- Cuando se usa un método ya establecido en un laboratorio diferente o con diferente analista o con diferente instrumental
- Para demostrar la equivalencia entre 2 métodos, por ej. Un método nuevo y una norma

# ¿Quién realiza la validación?

1. El laboratorio que usa un método es responsable de asegurar que está adecuadamente validado. Si se **usa un método normalizado validado**, el usuario solamente necesita establecer los datos de aptitud para el uso propio del método
2. Validación mediante un estudio colaborativo. Es el modo preferido de realizar la validación de un método
3. Cuando no es posible participar en interlaboratorios para validar el método, surgen las siguientes preguntas:
  1. ¿pueden los laboratorios validar métodos por su cuenta, y cómo?
  2. ¿pueden estos métodos validados ser reconocidos por otros laboratorios?
  3. ¿Qué clase de reconocimiento se puede esperar para los métodos caseros usados en un ámbito regulatorio?

# ¿quién realiza la validación?

## (cont.)

4. Ante un requisito regulatorio, un método analítico “casero” debería demostrar:
  - las tolerancias de todas las mediciones realizadas (volumen, temp., masas, etc.)
  - las formas de la sustancia medida incluyendo su especiación
  - el efecto de las interferencias y su cuantificación
  - las fuentes significativas de error y los métodos para controlarlas

# Elección, desarrollo y evaluación de métodos

Problema que requiere de un análisis químico



- 1ro. Identificar el método a usar o desarrollar uno nuevo
- 2do. Evaluar la aptitud del método (fit for purpose)

En esta etapa de evaluación se encuentra la validación “fit for purpose” se determina por cómo funciona el método cuando es usado por un laboratorista determinado y con el equipamiento disponible

# Elección, desarrollo y evaluación de métodos (cont.)

Requisitos analíticos	Características de aptitud relacionadas
¿cualitativo o cuantitativo?	Confirmación de la identidad, selectividad/especificidad, límite de detección, límite de cuantificación
¿El analito está disperso o localizado)	
¿El analito está presente en más de una forma? ¿Interesa si el analito es extractable, libre o total?	Confirmación de la identidad Recuperación
¿Cuál es el analito de interés y en qué nivel ( %, ug, etc)?	Confirmación de la identidad, límite de detección, límite de cuantificación, rango de trabajo
¿Cuán exacta y precisa debe ser la respuesta? /qué grado de incertidumbre se permite y cómo debe ser expresada?	Recuperación, exactitud, precisión de la repetibilidad, precisión de la reproducibilidad

# Elección, desarrollo y evaluación de métodos (cont.)

Requisitos analíticos	Características de aptitud relacionadas
¿Cuál es la naturaleza química, biológica y física de la matriz?	
¿Cuáles son las interferencias probables del analito?	Selectividad/especificidad
¿Se requiere muestreo y submuestreo (y esto se hará en el laboratorio?)	
¿Los resultados necesitan ser comparados con los resultados de otros laboratorios?	Robustez Precisión de la reproducibilidad
¿Los resultados necesitan ser comparados con especificaciones externas?	Exactitud Precisión de la reproducibilidad

# Desarrollo del método

- Adaptar un método existente y hacerlo adecuado para una nueva aplicación
- Desarrollar un método desde cero, aplicando el conocimiento y la experiencia, para lograr el método adecuado

# Los diferentes parámetros de desempeño de un método y lo que muestran

- Confirmación de la identidad y selectividad/especificidad
- Límite de detección
- Límite de cuantificación
- Intervalo de trabajo y ámbito lineal
- Exactitud
- Certeza
- Interpretación de las mediciones del margen de error
- Repetibilidad
- Reproducibilidad
- Medición de la incertidumbre
- Sensibilidad
- Robustez
- Recuperación

# Confirmación de la identidad y selectividad/especificidad

Confirmar la identidad es establecer que la señal producida en la medición, o que la propiedad medida que se atribuye al analito, solamente se debe al analito y no a la presencia de algo física o químicamente similar.

La efectividad del aislamiento o extracción del analito y la selectividad/especificidad de la medición determinan si otros componentes interfieren o no en la medición del analito

# Confirmación de la identidad y selectividad/especificidad (cont.)

**Selectividad y especificidad son medidas que calculan la fiabilidad de las mediciones en presencia de interferencias.**

**Selectividad (o especificidad)** = aptitud de un método para determinar exacta y específicamente el analito de interés en presencia de otros componentes en la matriz de la muestra bajo las condiciones establecidas del ensayo (NATA Tech)

**Especificidad** = aptitud de un método para medir solamente lo que se busca medir (AOAC-PVMC)

Es la aptitud de un método para valorar inequívocamente el analito en presencia de componentes que se sospecha que puedan estar presentes (impurezas, degradantes, matriz, etc.) (ICH Q2A, CPMP/ICH/381/95)

En general, se considera que especificidad = 100% selectividad

# Confirmación de la identidad y selectividad/especificidad (cont.)

¿Qué hacer?	¿Cuántas veces?	¿Qué calcular/qué determinar?	Comentarios
Analizar las muestras y los materiales de referencia por el método candidato y por otros métodos independientes	1	Usar los resultados de las técnicas confirmatorias para calcular/evaluar la aptitud del método para confirmar la identidad del analito y su aptitud par medir el analito aislado de las interferencias	Decidir cuánta debe ser la evidencia necesaria para obtener suficiente fiabilidad
Analizar muestras con cantidades agregadas de las interferencias esperadas en presencia de los analitos de interés	1	Examinar los efectos de las interferencias: si la presencia de la interferencia aumenta o inhibe la detección o cuantificación de los mesurandos	Si la detección o cuantificación es inhibida por las interferencias, se necesitará desarrollar más métodos

# Confirmación de la identidad y selectividad/especificidad (cont.)

Algunos protocolos de validación confunden confirmación de la identidad con repetibilidad.

Repetibilidad = una medición por una técnica varias veces

Identidad del analito = una medición por varias técnicas, preferentemente independientes

Otro aspecto a considerar es si el analito puede existir en la muestra en más de una forma: diferentes estados de oxidación, en forma inorgánica u organometálica, etc.

# Límite de detección

**Es la menor cantidad que puede ser distinguida del fondo con cierto nivel de confianza especificado.**

Para un resultado analítico que es muy cercano al valor del blanco, se plantea la duda de si el valor corresponde a valores aleatorios del blanco o a la presencia real del analito. La señal de fondo es producida por el blanco y exhibe ruido. El límite de detección (LD) corresponde a una señal  $k$  veces la desviación estándar del ruido de fondo.

Típicamente el valor de  $K$  es igual a 4 ( $LD=3\sigma_F$ ). Los valores por encima del LD pueden ser atribuidos a la presencia del analito y los valores por debajo del LD son indicativos de la ausencia de analito en cantidades detectables. (OAA; DC-LE-05)

Para una validación normalmente es suficiente proveer una indicación del nivel al cual la detección se vuelve problemática.

# Límite de detección (cont.)

## Procedimientos de determinación posibles

3 veces la dispersión, expresada como desviación estándar, a partir de mediciones repetidas del blanco o de soluciones del analito en agua pura

2,5 a 5 veces la relación señal/ruido del instrumento de medida a utilizar

# Límite de cuantificación

**Es la menor cantidad que puede ser determinada cuantitativamente con una incertidumbre asociada, para un dado nivel de confianza.**

Para el análisis cuantitativo debe quedar absolutamente claro que sólo se emplean valores atribuibles al analito.

El límite de cuantificación es entre 3 y 10 veces el límite de detección según cada caso (OAA, DC-LE-05)

# Límite de cuantificación (cont.)

- Se emplea cuando se realizan determinaciones de analitos a nivel de trazas

## Procedimientos de determinación habituales

De manera análoga al LD, en el cual el límite de cuantificación es como mínimo 3 veces el LD, según cada caso

Por determinación de una incertidumbre máxima permisible de los resultados (dada como dispersión relativa del 30% por ej) por medio de la determinación de la concentración más pequeña que se puede medir con este valor máximo. Este límite depende entonces de las exigencias de la incertidumbre

# Intervalo de trabajo y ámbito lineal

**Linealidad de un método:** define su aptitud para obtener resultados proporcionales a la concentración de analito.

**Rango lineal:** rango de concentraciones de analito para las cuales el método brinda resultados proporcionales a la concentración

Notar que refiere al rango de concentraciones en las soluciones que se están midiendo más que a las concentraciones de analito en las muestra original

En el extremo inferior del rango de concentraciones, los factores limitantes son los valores del LD y/o del límite de cuantificación

En el extremo superior del rango de concentraciones, las limitaciones aparecen por efectos varios que dependen de la respuesta del instrumento

# Intervalo de trabajo y ámbito lineal (cont.)

## Procedimiento según el OAA

- a. Se preparan 1 blanco y 6 concentraciones diferentes del analito a determinar o 6 muestras fortificadas a varias concentraciones. Preferentemente, las soluciones se deben preparar independientemente y no a partir de diluciones sucesivas del material de referencia
- b. Se representa la señal obtenida en función de la concentración y se determina el ámbito lineal y los extremos superior e inferior del intervalo de trabajo
- c. Se repiten los pasos a y b dentro del ámbito lineal y se efectúa un estudio estadístico de los resultados obtenidos
- d. Es preferible trabajar dentro del ámbito lineal
- e. Para la curva de calibración, conviene utilizar polinomios de ajuste de grado 2 como máximo

# Intervalo de trabajo y ámbito lineal (cont.)

Analizar	Repetic.	Qué calcular	Comentarios
1. Blanco + materiales de referencia o muestras fortificadas en vs concentrac	1	Graficar en el eje y la respuesta de medición y en el eje x las concentraciones de los mesurandos	Idealmente, las diferentes concentraciones deberían ser preparadas independientemente, y no a partir de alícuotas de la solución madre
Se necesitan al menos 6 concentraciones + el blanco		Examinar visualmente para identificar el rango lineal y los extremos sup e inf del intervalo de trabajo	Esto dará una confirmación visual de si el intervalo de trabajo es lineal o no

# Intervalo de trabajo y ámbito lineal (cont.)

Analizar	Repetic.	Qué calcular	Comentarios
<p>2. Repetir materiales de referencia o muestras fortificadas, en al menos 6 concentraciones diferentes, dentro del rango lineal</p>	<p>3</p>	<p>Graficar en el eje y la respuesta de medición y en el eje x las concentraciones de los mesurandos</p> <p>Examinar visualmente los outliers que pueden no ser reflejados en la regresión</p>	<p>Esta etapa es necesaria para ensayar un intervalo de trabajo, que se piensa que es lineal y en el que se intenta usar un solo punto de calibración</p>
		<p>Calcular el coef de regresión apropiado. Calcular y graficar los valores residuales</p>	<p>La distribución aleatoria sobre la línea recta confirma linealidad</p> <p>Tendencias sistemáticas indican no-linealidad</p>

# Exactitud

**Proximidad entre el resultado de una medición y el valor verdadero del mesurando (OAA DC-LE-05)**

La validación de un método busca cuantificar la exactitud probable de los resultados evaluando los efectos sistemáticos y azarosos sobre los resultados

Así, la exactitud se estudia normalmente como **certeza y precisión**

# Exactitud (cont.)

- **Certeza (de un método)** es una expresión de cuán cerca está la media de un conjunto de resultados (producidos por el método) del valor verdadero. Normalmente se expresa en términos de **sesgo**
- **Precisión** es una medida de cuán cerca están los resultados unos de otros, y generalmente se expresa por medidas como la desviación estándar, que describe la dispersión de los resultados

# Exactitud y certeza

## Procedimiento según el OAA

- Usar material de referencia certificado, preferentemente con una matriz semejante a la de la muestra
- Solo en el caso de no existir un material adecuado se puede realizar un ensayo de recuperación
- Cuando sea posible, se realizan un mínimo de 10 repeticiones del ensayo 3 días consecutivos
- Se compara el promedio de los valores obtenidos ( $\bar{X}$ ) con el valor de referencia certificado ( $\mu$ ), teniendo en cuenta la incertidumbre asociada de ese material
- El módulo de la diferencia da como resultado el sesgo del método  $s = |\bar{X} - \mu|$

# Precisión

**Proximidad entre valores de una magnitud obtenidos por mediciones replicadas, en condiciones específicas (IRAM 34552-1)**

Las dos medidas de precisión más comunes son **repetibilidad** y **reproducibilidad**, que representan los dos extremos de la precisión que se pueden obtener

# Precisión (cont)

**Repetibilidad** = la más pequeña precisión esperada. Da una idea del tipo de variabilidad que se puede esperar cuando el método es desarrollado por un mismo analista en un mismo equipo a lo largo de un periodo de tiempo corto. Ej., la variabilidad esperada entre los resultados cuando la muestra es analizada por duplicado

**Reproducibilidad** = la precisión más grande esperada. Una muestra analizada por varios laboratorios. Formalmente, excluye la variación respecto del tiempo.

# Precisión (cont)

- (**Precisión intermedia** = un análisis realizado por laboratoristas diferentes en un mismo laboratorio durante un periodo de tiempo prolongado)
- Generalmente la precisión se establece en términos de desviación estándar o desviación estándar relativa
- La repetibilidad y la reproducibilidad dependen de la concentración de analito y en consecuencia, debieran determinarse para varias concentraciones

Analizar	Repeticiones (independientes)	Calcular	Comentarios
Estándares, materiales de referencia o muestras fortificadas, en varias concentraciones a lo largo del intervalo de trabajo			
a. Mismo analista, equipo, laboratorio. Corto periodo de tiempo	10	Desv estándar para cada concentración	Se determina la desv estándar de la repetibilidad para c/concent
b. Diferentes analistas y equipos, mismo laboratorio, mayor tiempo	10	Desv estándar para cada concentración	Se determina la desv estándar de la reproducibilidad intra-laboratorio para c/concent
c. Diferentes analistas, equipos, laboratorios, mayor periodo de tiempo	10	Desv estándar para cada concentración	Se determina la desv estándar de la reproducibilidad inter-laboratorio para c/concent. Requiere estudios colaborativos

# Repetibilidad y Reproducibilidad

- A partir de la desviación estándar de la repetibilidad ( $\sigma$  o  $s_r$ ) es útil calcular el **límite de repetibilidad “r”**, el cual le permite al analista decidir si es significativa la diferencia entre análisis duplicados de una muestra, realizados en condiciones de repetibilidad.
- A partir de la desviación estándar de la reproducibilidad ( $\sigma$  o  $s_r$ ) es útil calcular el **límite de reproducibilidad “R”**, el cual le permite al analista decidir si es significativa la diferencia entre análisis duplicados de una muestra, realizados en condiciones de reproducibilidad.

# Medición de la incertidumbre

**Parámetro, asociado al resultado de una medición, que caracteriza la dispersión de los valores que podrían ser razonablemente atribuidos al mesurando (OAA. DC-LE-05)**

Generalmente es una desviación estándar o un intervalo de confianza y su estimación toma en cuenta todos los efectos reconocidos que operan sobre el resultado

# Medición de la incertidumbre (cont.)

Según OAA, es un parámetro de identificación central e inalienable para preparar una acreditación según ISO 17025. Incluye los errores sistemáticos y aleatorios.

Para su determinación y especificación existen varias posibilidades:

- Indicación acerca de la repetibilidad
- Resultados de las cartas de control
- Resultado de intercomparaciones
- Evaluación por miembros del personal experimentados, competentes y, por lo tanto, autorizados

# Sensibilidad

**Cambio en la respuesta de un instrumento de medición dividido por el cambio en el estímulo correspondiente (ejemplo de estímulo: cantidad de mesurando presente) (IUPAC)**

- Es el cambio de la respuesta del instrumental que se corresponde con el cambio de la concentración del analito.
- Dentro del rango lineal de un método, si se intercepta la curva de respuesta, la sensibilidad es un parámetro útil para calcular y usar en la fórmula de cuantificación.
- A veces se usa la sensibilidad para referirse al límite de detección del equipo, pero esto no se aprueba generalmente.

# Robustez

**Medida de la capacidad de un procedimiento analítico para no ser afectado por variaciones pequeñas pero deliberadas en los parámetros del método y que provee una indicación de su fiabilidad durante su uso habitual (ICH Q2A)**

**Ensayo de robustez:** interlaboratorio para estudiar el comportamiento de un procedimiento analítico cuando se hacen pequeños cambios en las condiciones ambientales y/o de operación. Involucra variaciones deliberadas en el método.

Permite identificar aquellas variables que provocarán cambios significativos y que deberían ser controladas más estrictamente

Los ensayos de robustez generalmente se aplican para investigar los efectos sobre la precisión y la exactitud.

# Recuperación

**Fracción de analito que se agrega a una muestra de ensayo (fortificada o “spiked”) antes del análisis.**

Objetivo: evaluar la eficiencia del método para detectar todo el analito presente en una muestra

# **Uso de métodos validados**

# En teoría...


Los métodos normalizados son producidos mediante algún tipo de estudio en colaboración, comparativo, y los organismos de normalización que los llevan a cabo, tienen frecuentemente expertos estadísticos que aseguran que esos estudios de validación están correctamente diseñados, realizados y evaluados. Sin embargo es peligroso asumir que sólo porque un método está normalizado uno tiene la garantía de que esa validación será adecuada.


# Reglas aconsejadas para cuando se usan método validados

1. El analista debe familiarizarse completamente con el método antes de usarlo por primera vez:
  1. Lograr la repetibilidad, límite de detección, etc.
  2. Conocer la teoría del método, identificar los puntos sensibles
  3. Estabilidad de los reactivos, soluciones, etc.
2. Evaluar cuántas muestras es conveniente procesar al mismo tiempo. Es mejor analizar bien pocas muestras que tratar de analizar muchas y tener que repetir casi todas
3. Asegurarse de que todas las cosas (reactivos, equipamiento, etc.) para el método están disponibles antes de comenzar el trabajo

Cuando se adapta o cambia un método validado por otro, se necesita revalidar ese método

# **Uso de los datos de validación para control de calidad**

- 
- **Aseguramiento de la calidad:** se relaciona con todas las medidas que toma un laboratorio para asegurar y controlar su calidad
  - **Control de calidad:** describe las medidas individuales relacionadas con el monitoreo y control de operaciones analíticas particulares

- 
- La validación de un método brinda una idea de las capacidades y limitaciones de la performance de ese método que se pueden experimentar durante el uso rutinario
  - Durante la validación el método se aplica a muestras de contenido conocido
  - Una vez que el método tiene un uso rutinario, se aplica para muestras de contenido desconocido
  - En la práctica, se recomienda continuar midiendo esas muestras de composición conocida con cada batch de muestras como parte del proceso de control de la calidad.
  - El control de calidad puede realizarse dentro del laboratorio o de manera externa (interlaboratorios)

# Control de calidad interno

- Incluye el uso de blancos, patrones de calibración, muestras fortificadas, blind samples, réplicas de ensayos, muestras QC y cartas de control
- La clase de QC adoptado debe demostrar suficiencia para demostrar la validez de los resultados. Ej: muestras QC, analizadas a intervalos regulares, uso de varios tipos de blancos, réplicas para chequear la repetibilidad, etc
- **Muestras QC:** muestras que a lo largo de un periodo de tiempo dado son suficientemente estables y homogéneas para brindar el mismo resultado y que están disponibles en cantidad suficiente para usarse en análisis repetitivos.

# Control de calidad externo

- Ensayos de proeficiencia
  - Método reconocido para que un laboratorio monitoree su performance contra sus propios exigencias y la generalidad de los requisitos de otros laboratorios
  - Ayudan a resaltar la reproducibilidad entre laboratorios y los errores sistemáticos, por ej. Sesgo

# **Fin de esta presentación**

**La bibliografía que complementa este resumen estará disponible en la página web de la AACCS**

*Muchas gracias a todos!!*

*Ing. Ariel Soso, Bioq. Alejandro Rimini,*

*Ing. Liliana Marbán y Lic. Viviana Fiorani*