

VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

1. Vocabulario internacional de metrología

Disponible en:

<http://www.bipm.org/en/publications/guides/vim.html>

2. The Fitness for Purpose of Analytical Methods: A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics (2014)

Disponible en:

<https://www.eurachem.org/index.php/publications/guides/mv>

3. Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement, 3rd Edition (2012)

Disponible en:

<https://www.eurachem.org/index.php/publications/guides/quam>

- Prácticamente todos los aspectos de la sociedad se apoyan en el trabajo analítico
- Costo de la mediciones es alto y las decisiones que se toman a partir de los resultados también tiene efectos (no solo económicos)
- El cliente confía en los resultados del Laboratorio, los resultados deben ser confiables
- La validación da al Laboratorio y a los analistas una mayor confianza en sus resultados

ISO/IEC 17025 – Numeral 5.4.2

“El laboratorio **debe** utilizar los métodos de ensayo o de calibración, incluidos los de muestreo, que satisfagan las necesidades del cliente y que **sean apropiados** para los ensayos o las calibraciones que realiza...”

y además:

“Cuando el cliente no especifique el método a utilizar, el **laboratorio debe seleccionar los métodos apropiados...**”

Definición	Referencia
Confirmación, a través de la aportación de evidencia objetiva, de que se han cumplido los requisitos para un uso o aplicación específico previsto	ISO 9000
Confirmación, a través del examen y aportación de evidencias objetivas, de que se cumplen los requisitos particulares para un uso específico previsto	ISO/IEC 17025
verificación, donde los requisitos especificados son adecuados para un uso previsto	VIM (a)

(a) VIM define ‘verificación’ como “aportación de evidencia objetiva de que un elemento dado satisface los requisitos especificados”

ISO/IEC 17025 – Numeral 5.4.5.2

El laboratorio **debe** validar:

- Métodos no normalizados
- Métodos desarrollados por el laboratorio
- Métodos normalizados usados fuera de su ámbito de aplicación
- Ampliaciones o modificaciones de métodos normalizados

¿debo validar si adopto un método normalizado?

ISO/IEC 17025 – Numeral 5.4.2

“El laboratorio **debe** confirmar que puede operar adecuadamente los métodos normalizados antes de introducir los ensayos”

También verificar cambios importantes

ISO/IEC 17025 – Numeral 5.4.5.3

“La validación es siempre un equilibrio entre los costos, los riesgos y las posibilidades técnicas. Existen muchos casos en los que la gama y la incertidumbre de los valores (por ejemplo, la exactitud, el límite de detección, la selectividad, la linealidad, la repetibilidad, la reproducibilidad, la robustez y la sensibilidad cruzada) sólo pueden ser dadas en una forma simplificada debido a la falta de información.”

!!! EJEMPLO !!!

Característica	Tipo de aplicación analítica		
	Ensayo de identificación	Ensayo de cuantificación de impurezas	Cuantificación del componente principal
Selectividad	X	X	X
Límite de detección		(¿?)	
Límite de cuantificación		X	
Rango de trabajo		X	X
Veracidad (Sesgo)		X	X
Precisión		X	X

Características de desempeño

Selectividad

Límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ)

Intervalo de trabajo

Sensibilidad analítica

Veracidad (Sesgo, recuperación)

Precisión (repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad)

Incertidumbre de medida (a)

Robustez

(a) En sentido estricto, la incertidumbre de medida no es una característica del desempeño de un procedimiento de medida particular pero sí de los resultados obtenidos al usar dicho procedimiento.

Pregunta	Característica
¿La respuesta es cualitativa o cuantitativa?	Selectividad LOD y/o LOQ
¿Cuáles son los analitos de interés presentes y los niveles probables (% , $\mu\text{g/g}$, ng/g , etc)? ¿Están presentes en más de una forma química (i.e. estados de oxidación, estereoisómeros), y es necesario distinguir entre las diferentes formas?	Selectividad LOD y/o LOQ Rango de trabajo
¿Qué magnitud requiere ser medida ('el mensurando')? ¿Interesa medir la concentración 'total' del analito presente o la 'cantidad extraída' bajo condiciones concretas?	Recuperación

Pregunta	Característica
<p>¿Qué veracidad y precisión se requieren? ¿Cuál es la incertidumbre objetivo y como debe expresarse?</p>	<p>Veracidad y recuperación Precisión Incertidumbre</p>
<p>¿Cuáles son las interferencias más probables del analito(s)?</p>	<p>Selectividad</p>
<p>¿Se han establecido tolerancias para los parámetros críticos de desempeño del análisis (i.e. tiempo de extracción, temperatura de incubación)?</p>	<p>Robustez</p>

Pregunta

¿Los resultados necesitan ser comparados con los de otros laboratorios?
¿Los resultados necesitan ser comparados con especificaciones externas?

Característica

Incertidumbre

Selectividad

EURACHEM

“el grado en el que un método puede ser utilizado para determinar analitos particulares en mezclas o matrices, sin interferencias de otros componentes de comportamiento similar”

VIM

"la propiedad de un sistema de medición, usado con un procedimiento de medición especificado, por el cual proporciona valores medidos para uno o varios mensurandos de tal manera que los valores de cada mensurando son independientes de otros mensurandos u otras cantidades en el fenómeno, cuerpo, o sustancia siendo investigada "

¿Qué hacer?	¿Cuántas veces ?	¿Qué calcular/determinar a partir de la información ?	Comentarios
Analice muestras de ensayo y MR por el método candidato y otros métodos independientes	1	Use los resultados de las técnicas confirmatorias para evaluar la capacidad del método para confirmar la identidad del analito y su capacidad para medir el analito aislado de otras interferencias.	Decida qué cantidad razonable de información adicional es necesaria para conferir suficiente confiabilidad
Analice muestras de ensayo conteniendo varias interferencias sospechadas en la presencia de los analitos de interés.	1	Examine el efecto de las interferencias. ¿La presencia de la interferencia inhibe la detección y cuantificación de los analitos?	Si la detección o cuantificación es inhibida por las interferencias, será necesario continuar con el desarrollo del método.

Límite de detección

VIM

"el valor medido, obtenido según un procedimiento de medida dado, para el cual la probabilidad de falsamente reclamar la ausencia de un componente en un material es β , considerando una probabilidad α de falsamente reclamar su presencia"

¿Qué hacer?	¿Cuántas veces ?	¿Qué calcular/determinar a partir de la información ?	Comentarios
<p>Medidas replicadas de muestras blanco, es decir matrices que no contengan cantidades detectables del analito.</p> <p>o</p> <p>Medidas replicadas de la muestra de ensayo con una baja concentración del analito.</p>	<p>10</p>	<p>Calcule la desviación estándar, s_0, de los resultados.</p> <p>Calcule LOD como $LOD = 3 \times s_0$</p> <p>.</p>	<p>Cuando no es posible tener muestras blanco o de baja concentración, use blancos de reactivo en lugar de muestras blanco.</p>

Límite de cuantificación

EURACHEM

"El LOQ es el mínimo nivel de analito que puede ser determinado con desempeño aceptable. "

¿Qué hacer?	¿Cuántas veces ?	¿Qué calcular/determinar a partir de la información ?	Comentarios
<p>Medidas replicadas de muestras blanco, es decir matrices que no contengan cantidades detectables del analito.</p> <p>o</p> <p>Medidas replicadas de la muestra de ensayo con una baja concentración del analito.</p>	<p>10</p>	<p>Calcule la desviación estándar, s_0, de los resultados.</p> <p>Calcule LOD como $LOD = kQ \times s_0$</p> <p>.</p>	<p>Cuando no es posible tener muestras blanco o de baja concentración, use blancos de reactivo en lugar de muestras blanco.</p> <p>kQ es usualmente 10.</p>

Rango de trabajo

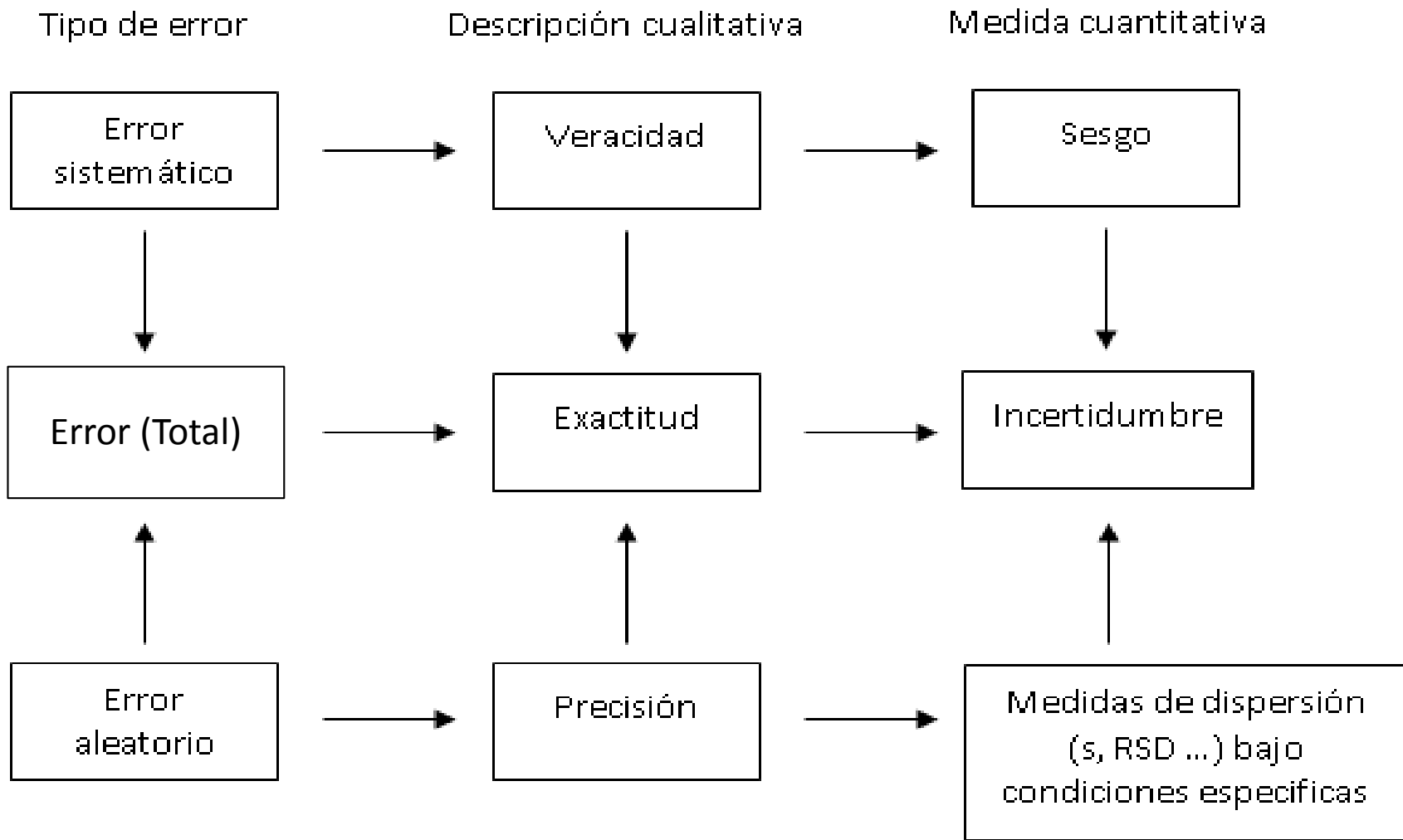
EURACHEM

" es el intervalo en el cual el método proporciona resultados con una incertidumbre aceptable. "

El extremo inferior del intervalo de trabajo está determinado por el límite de cuantificación, LOQ. El extremo superior del intervalo de trabajo está definido por las concentraciones a las cuales se observan anomalías significativas en la sensibilidad analítica.

¿Qué hacer?	¿Cuántas veces ?	¿Qué calcular/determinar a partir de la información ?	Comentarios
<p>Curvas de calibración con mínimo 5 niveles de concentración (incluyendo el cero si es posible)</p>	<p>6</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Graficar. Evaluación visual. - Modelo. Relación concentración vs respuesta. - Evaluar estadísticas de regresión y residuales - Pruebas estadísticas adicionales - Describir la formula matemática de la curva seleccionada 	<ul style="list-style-type: none"> - Espaciar uniformemente las concentraciones seleccionadas en el rango. - No realizar diluciones seriales - Aleatorizar el orden de análisis de los patrones

Exactitud



VIM

“cercanía de acuerdo entre un valor medido y el valor verdadero del mensurando”

EURACHEM

“la validación de métodos trata de investigar la exactitud de los resultados evaluando los efectos sistemáticos y aleatorios sobre resultados individuales. Por lo tanto, normalmente la exactitud se estudia como dos componentes: veracidad y precisión.”

VIM

"la cercanía de acuerdo entre el promedio de un número infinito de valores medidos y un valor de referencia "

La determinación práctica del sesgo se basa en la comparación de la media de los resultados del método candidato con un valor de referencia adecuado.

El valor de referencia puede ser:

- a. Análisis de materiales de referencia certificados
- b. Experimentos de recuperación utilizando muestras adicionadas
- c. Comparación con resultados obtenidos por otro método.

VIM

"la cercanía de acuerdo entre valores medidos obtenidos por mediciones replicadas sobre el mismo u objetos similares bajo condiciones específicas"

Condiciones específicas:

- a. Repetibilidad
- b. Precisión intermedia
- c. Reproducibilidad

La evaluación práctica de la precisión requiere la realización de mediciones repetidas en materiales adecuados

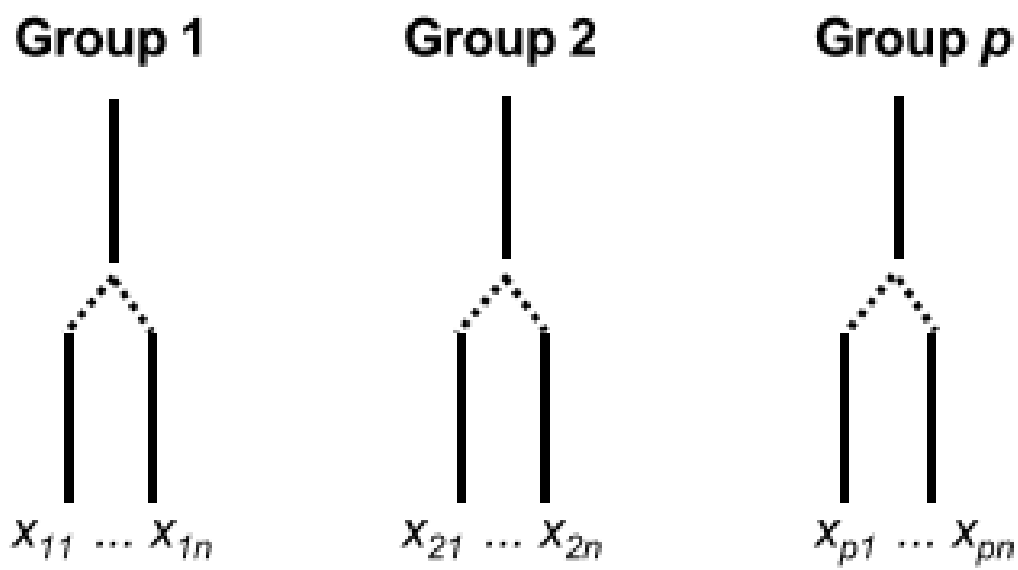
¿Qué hacer?	¿Cuántas veces ?	¿Qué calcular/determinar a partir de la información ?
<ul style="list-style-type: none"> • Matriz blanco • Material de referencia certificado (CRM). • Matriz blanco fortificada en nivel 1 de concentración • Matriz blanco fortificada en nivel 2 de concentración • Matriz blanco fortificada en nivel 3 de concentración 	6 veces (Duplicado dentro de cada lote)	ANOVA

¿Qué hacer?

- Curva de calibración
- Blanco de reactivos
- Matriz blanco
- Material de referencia certificado (CRM).
- Matriz blanco fortificada en nivel 1 de concentración
- Matriz blanco fortificada en nivel 2 de concentración
- Matriz blanco fortificada en nivel 3 de concentración

¿Cuántas veces ?

6 veces (Duplicado dentro de cada lote - Excepto la curva de calibración)



Fuente de variación	Suma de cuadrados (SS)	ν	Cuadrado medio (MS)
Entre grupos	SS_b	$p-1$	$MS_b = SS_b / (p-1)$
Dentro de grupos	SS_w	$N-p$	$MS_w = SS_w / (N-p)$
Total	$SS_{tot} = SS_b + SS_w$	$N-1$	

$$s_r = \sqrt{MS_w} \quad \text{Repetibilidad}$$

$$s_{between} = \sqrt{\frac{(MS_b - MS_w)}{n}}$$

$$s_I = \sqrt{s_r^2 + s_{between}^2} \quad \text{Precisión intermedia}$$

Robustez

EURACHEM

“La robustez de un procedimiento analítico es una medida de su capacidad para permanecer no afectado por pequeñas variaciones premeditadas de los parámetros del método. La robustez proporciona una indicación de la fiabilidad del método durante su uso normal”

¿Qué hacer?	¿Cuántas veces ?	¿Qué calcular/determinar a partir de la información ?
<p>Identificar las variables que podrían tener un efecto significativo en el desempeño del método.</p>	<p>Evaluated more effectively using experimental designs.</p>	<p>Determine the effect of each change in condition on the results of the measurement.</p>
<p>Establish experiments (analyzing MR or samples of assay) to supervise the effect on the results of the measurement by systematically changing the variables.</p>	<p>For example: 7 parameters can be studied in 8 experiments using a Plackett-Burman or Youden-Steiner design.</p>	<p>Perform significance tests to determine if the observed effects are statistically significant.</p>

Diseño Youden-Steiner

Factor	Ensayos							
	1	2	3	4	5	6	7	8
A/a	A	A	A	A	a	a	a	a
B/b	B	B	b	b	B	B	b	b
C/c	C	c	C	c	C	c	C	c
D/d	D	D	d	d	d	d	D	D
E/e	E	e	E	e	e	E	e	E
F/f	F	f	f	F	F	f	f	F
G/g	G	g	g	G	g	G	G	g
Resultado	s	t	u	v	w	x	y	z

La comparación de las medias de los resultados revela el efecto de cambiar el valor “normal” por el alternativo. A continuación se presenta el modelo para el cálculo de la diferencia de la respuesta para cada parámetro.

Parámetros	Diferencia
A-a	$V_A = (s+t+u+v)/4 - (w+x+y+z)/4$
B-b	$V_B = (s+t+w+x)/4 - (u+v+y+z)/4$
C-c	$V_C = (s+u+w+y)/4 - (t+v+x+z)/4$
D-d	$V_D = (s+t+y+z)/4 - (u+v+w+x)/4$
E-e	$V_E = (s+u+x+z)/4 - (t+v+w+y)/4$
F-f	$V_F = (s+v+w+z)/4 - (t+u+x+y)/4$
G-g	$V_G = (s+v+x+y)/4 - (t+u+x+z)/4$

Para decidir si un parámetro tiene influencia significativa sobre el resultado, se compara la diferencia obtenida para el cambio efectuado sobre este parámetro y el producto de s (desviación estándar del estudio de precisión) y raíz de 2 por ejemplo,

Si $|V_B| > s \sqrt{2}$ entonces la diferencia es significativa, es un factor crítico.

Incertidumbre

EURACHEM

“Parámetro asociado al resultado de una medida, que caracteriza la dispersión de los valores que podrían razonablemente ser atribuidos al mensurando”

VIM

“Parámetro no negativo que caracteriza la dispersión de valores atribuidos a un mensurando, basada en la información utilizada”

El calculo de la incertidumbre utiliza:

- a. La mejor estimación disponible de la precisión
- b. La mejor estimación disponible del sesgo y su incertidumbre
- c. La cuantificación de cualquier incertidumbre asociada a efectos que no se han tenido lo suficientemente en cuenta en el estudio de validación.

¿Qué hacer?

- Curva de calibración
- Blanco de reactivos
- Matriz blanco
- Material de referencia certificado (CRM).
- Matriz blanco fortificada en nivel 1 de concentración
- Matriz blanco fortificada en nivel 2 de concentración
- Matriz blanco fortificada en nivel 3 de concentración

¿Cuántas veces ?

6 veces (Duplicado dentro de cada lote)

VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

GRACIAS