

VALIDACION DE METODOS

El proceso analítico

Calidad y objetivos de la Química Analítica

Validación del método analítico

Etapas

Puntos y gráficos de control

Materiales de referencia

Buenas prácticas de laboratorio (GLP)

Normalización

Métodos de validación interna

Precisión

Exactitud y bias

Límite de detección y cantidades relacionadas

Sensibilidad

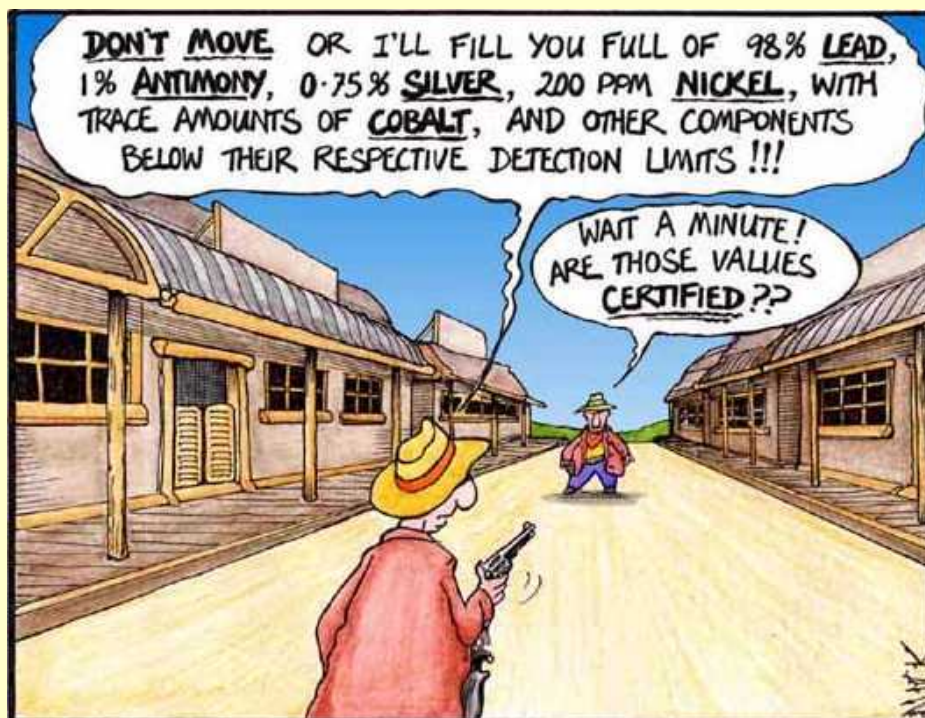
Selectividad e interferencias

Métodos de validación externa

Comparación de métodos

Repetitividad y reproducibilidad

Comparación de laboratorios



EL PROCESO ANALÍTICO

Etapa	Interacción	Ejemplo
Definición general del problema	Cliente	Vertido procedente de los lixiviados de un vertedero
Definición analítica del problema y definición del objetivo	Cliente ↔ Analista	Cuán contaminado está el acuífero
Selección del procedimiento	Analista	Determinación de los metales pesados en agua subterránea
Muestreo	Cliente + Analista	Inventario de puntos Elección de los más adecuados Plan de muestreo
Transporte y almacenamiento	(Cliente +) Analista	Cámara frigorífica y acidificación
Preparación de la muestra	Analista	Filtración a 0,45 µm
Medida	Analista	Determinación por ETAAS
Evaluación de datos	Analista	Cuantificación de los contenidos
Conclusiones	Analista	Están los valores dentro de los habituales del método
Informe	Analista ↔ Cliente	Recomendaciones para seguimiento y remedio del problema

EL METODO ANALITICO

Forma en que el analista obtiene la información

Adaptado a los propósitos requeridos.

Se debe seleccionar el método adecuado e identificar sus posibles fuentes de error.

Se selecciona una vez conocido el problema analítico.

La primera vez, debe hacerse una revisión bibliográfica. La experiencia propia y ajena es de gran interés.

La clave consiste en convertir al analito de la muestra en una forma que sea compatible con la técnica o método de análisis elegida. Todos los pasos del método deben ser analizados y validados de forma que se obtengan datos que resulten precisos y veraces.

Método oficial: Método requerido por ley o por una regulación dada por una agencia oficial (EPA, Directivas Europeas...)

Método de referencia o patrones de consenso: Métodos desarrollados por organismos que utilizan estudios interlaboratorios para validarlos.

Método modificado: Método patrón o de referencia modificado para adaptarlo a las condiciones actuales o a otro tipo de muestras.

Método rápido: Método para la determinación rápida de gran número de muestras

Método de rutina: Método utilizado rutinariamente en la práctica diaria. Pueden ser oficiales o de referencia.

Método automatizado: Método que emplea equipo automatizado

Método definitivo: Método de elevado nivel científico aplicado en un laboratorio reconocido por su gran calidad

EL METODO ANALITICO

ISO clasifica los métodos sobre la base del calibrado

Calibrado o calibración: Conjunto de operaciones que establecen, bajo condiciones específicas, la relación entre los valores indicados por un instrumento o sistema de medida, y los correspondientes valores conocidos de un mesurando.

Métodos calculables (absolutos)

Origina el resultado llevando a cabo un cálculo definido sobre la base de las leyes que rigen los parámetros físicos y químicos implicados, utilizando medidas tomadas durante el análisis como: peso de muestra, volumen de reactivo, peso de precipitado, cantidad de electricidad, etc.

Métodos relativos

Compara la muestra analizada con un conjunto de muestras de calibración con contenido conocido, utilizando la respuesta (idealmente lineal) de un sistema de detección. El valor de la muestra se determina por interpolación. Estos métodos son poco sensibles a diferencias entre las muestras y los patrones de calibrado.

Métodos comparativos

Análogos a los anteriores, pero sensibles a diferencia de matriz. Son métodos rápidos que deben calibrarse con Material de Referencia Certificado (MRC) o con un Material de Referencia (MR).

Las categorías ISO difieren en la forma en que se establece la concentración de la muestra, es decir en la forma en que está vinculada la señal de la sustancia en la muestra con la señal de la sustancia en el conjunto de calibrado.

TRAZABILIDAD

El vínculo anterior puede establecerse directamente con una cantidad de sustancia de estequiometría y pureza conocidas para métodos calculables y relativos, o con un MRC o MR para los comparativos. El vínculo, si transcurre a través de una cadena ininterrumpida hasta los adecuados patrones, se denomina trazabilidad

Posibilidad o habilidad de trazar la historia, aplicación o localización de un elemento o actividad por medio de una identificación registrada

Todos los pasos del procedimiento analítico deben llevarse a cabo y anotarse de forma que se registre toda la información esencial y no se introduzca información equivocada.

En otras palabras, los resultados de la determinación y no solo la medida final, deben estar ligados a través de una cadena ininterrumpida de comparaciones hasta los adecuados patrones de medida, generalmente patrones nacionales o internacionales (p.e unidades básicas del SI, constantes, MRC). Este vínculo debe ser demostrable.

CARACTERIZACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO

Relativos a la calidad del resultado analítico	Relativos a aspectos económicos
PRIMARIOS Precisión Bias, Exactitud y/o veracidad Límite de detección	Inversión a realizar Duración del análisis Precauciones de seguridad
SECUNDARIOS Linealidad Intervalo de utilización Límite de cuantificación Selectividad Sensibilidad Robustez (Ruggedness)	Instalaciones y mantenimiento entrenamiento del personal Eliminación de muestras Costes de reactivos

Precisión: Medida de la dispersión de las medidas alrededor de la media

Bias: Errores sistemáticos causados por el método y/o el laboratorio

Exactitud: Término impreciso. Antes relacionado con la falta de bias. Ahora la ISO lo define de otra forma

Límite de detección: Mínima concentración de analito que puede diferenciarse del fondo. Señal igual a k veces la desviación típica del fondo. Habitualmente $k=3$.

Linealidad: Propiedad de la línea de calibrado.

Límite de cuantificación: Mínima concentración de analito que puede determinarse con la suficiente precisión y exactitud. Señal igual a $k=10$ veces la desviación típica del fondo

Intervalo de utilización: Rango en el que se puede utilizar la línea de calibrado.

Sensibilidad: $S = d(\text{Señal}) / d(\text{concentración})$

Selectividad: Indica como afecta la presencia de otros componentes de la muestra. El término especificidad debe ser evitado

Robustez: Indica como afecta al resultado la variación de algunos parámetros operacionales

CALIDAD Y OBJETIVOS DE LA QUIMICA ANALITICA

Los resultados procedentes de un análisis o resultados analíticos son de gran importancia a la hora de **tomar decisiones** en diversas esferas humanas: medio ambiente, alimentos, medicinas, industria, etc.

Se ha estimado que al menos un **5% del P.I.B.** de los países desarrollados se dedican a llevar a cabo determinaciones analíticas.

Por tanto esas medidas deben ser de **calidad**. Para ello se utiliza lo que la ISO define como

Quality Assurance QA (Aseguramiento de la Calidad): Acciones planificadas y sistemáticas necesarias para proporcionar la confianza de que un producto, proceso o servicio satisface los requisitos de calidad fijados.

Calidad: La totalidad de las características y propiedades de un producto de un servicio o producto que permiten que satisfaga necesidades implícitas o fijadas.

Control de calidad: Técnicas y actividades operacionales que se emplean para cumplir los requisitos de calidad.

Sistema de Calidad: Organización estructural, responsabilidades, procedimientos y recursos para implementar la calidad.

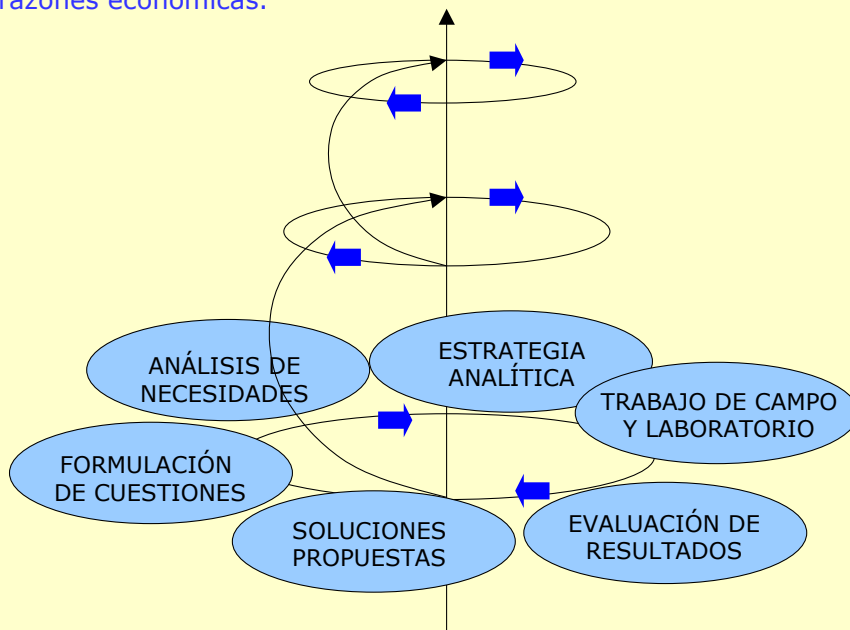
Organización (management) de Calidad: Aspectos organizativos que determinan e implementan la política de calidad

Política de Calidad: Decisiones de alto nivel relativas a las intenciones y directrices sobre la calidad global

CALIDAD DE LOS DATOS ANALÍTICOS

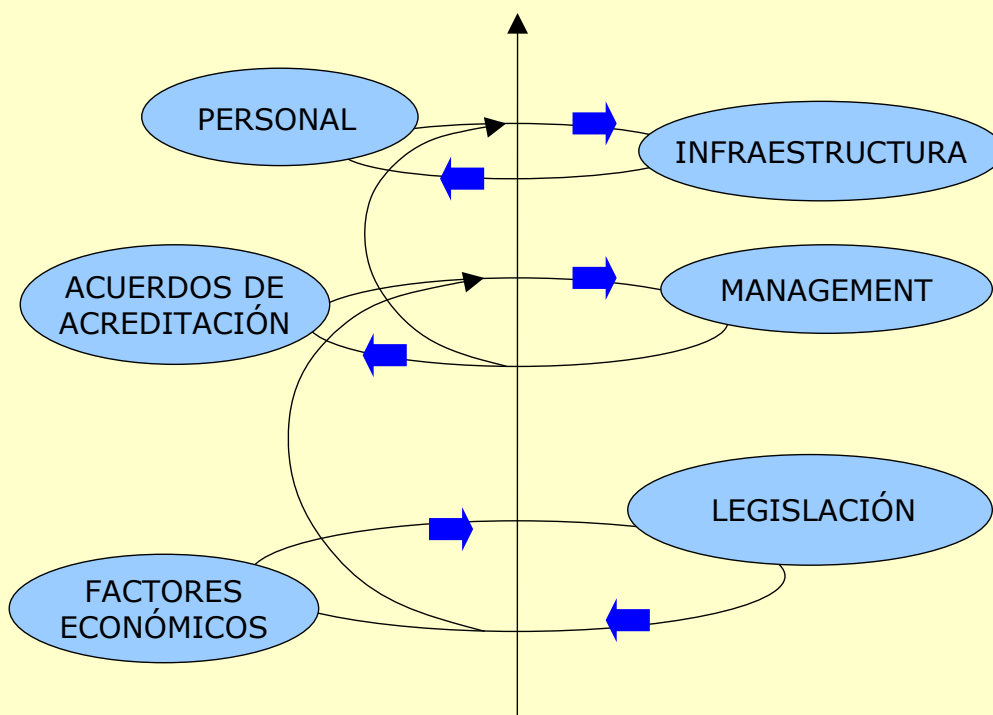
La Calidad del servicio prestado mejora si el analista y el cliente interactúan en busca de la respuesta solicitada.

Para ello se hace uso de la espiral de calidad. Si al final del círculo no se obtiene una respuesta satisfactoria, el proceso se repite una vez más. El número de círculos debe ser pequeño por razones económicas.



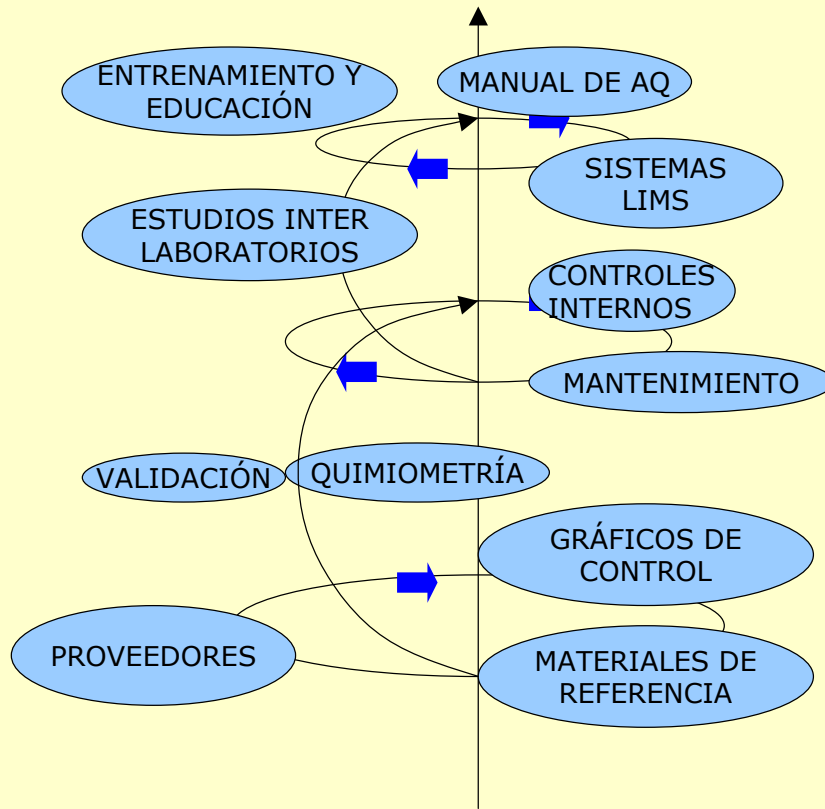
Por tanto el analista o el químico analítico no debe limitarse a originar resultados sino que debe participar en la formulación de preguntas y respuestas.

CALIDAD DE LOS DATOS ANALÍTICOS



Parámetros que influyen sobre la espiral de calidad

CALIDAD DE LOS DATOS ANALÍTICOS



Herramientas disponibles para el control de calidad en laboratorios de análisis

VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

Proceso que permite demostrar que los resultados producidos por el mismo son fiables y reproducibles, y que el método es adecuado para la aplicación sobre la que se emplea.

Consiste en documentar la calidad del procedimiento analítico determinando sus características (performance) sobre la base de criterios tales como la exactitud, precisión, límite de detección, etc.

Este proceso obliga a que el analista investigue todas las posibles fuentes de error y las elimine. De esta forma demostrará que el método origina resultados que pueden ser trazados hasta las referencias elegidas.

Se precisan buenas estructuras, personal entrenado y motivado e instrumentos adaptados al fin perseguido y convenientemente mantenidos.

CONSIDERACIONES PREVIAS

Validación de la instrumentación

Anterior a la validación del método.

Verificación de especificaciones de los equipos

Revisión bibliográfica

Muy pocos métodos analíticos están lo suficientemente detallados y validados para ser aplicados directamente

La transferencia directa de métodos no es recomendable.

La revisión bibliográfica solo indica cuál es el mejor método

VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

Raras veces puede medirse directamente la propiedad de interés (p.e el contenido en metales pesados en una muestra de mejillones).

Se toma una **muestra representativa** y se convierte o separa el analito en una forma **compatible** con el detector empleado.

Cada paso es una **f fuente potencial de error** que se añade a la incertidumbre total de la determinación. Esas fuentes deben eliminarse o minimizarse.

Estrategia: **estudiar el procedimiento analítico hacia atrás**, estudiando primero el sistema más sencillo (p.e. las disoluciones empleadas en el calibrado), y después paso a paso hasta la muestra real.

Los errores **aleatorios** pueden ser detectados y minimizados mediante medidas **intra-laboratorio**

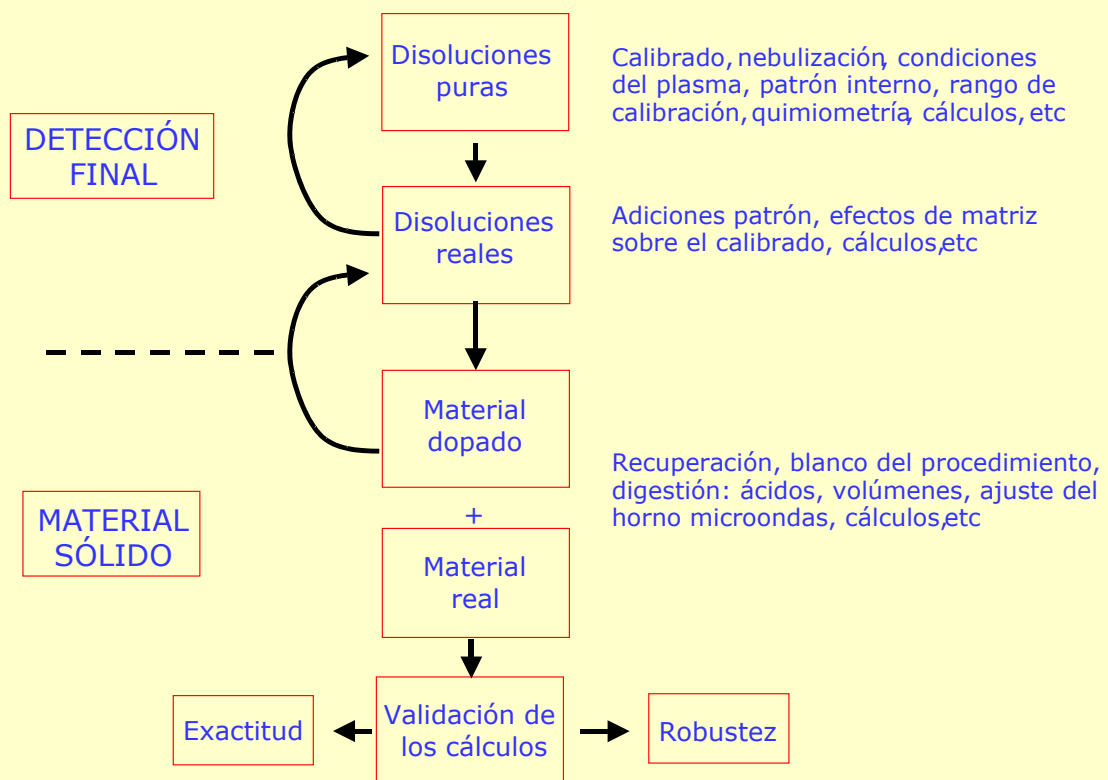
Los errores **sistemáticos** (bias o sesgos) pueden ser detectados y eliminados mediante medidas **internas** (uso de MRC) o **externas** (ejercicios de comparación inter-laboratorios)

La **robustez** del procedimiento (Propiedad de ser relativamente insensible a cambios pequeños del procedimiento) también debe evaluarse p.e. calidad de los reactivos, cambio de analista, condiciones ambientales, etc

Los **métodos patrón o normalizados (estandarizados)** son de **validación sencilla**: Basta con evaluar la precisión, verificar la veracidad, e investigar la sensibilidad y la robustez.

Si el **método ha sido desarrollado** por el propio analista o en su laboratorio, debe llevarse a cabo un **proceso total de validación**: Se divide el proceso, se demuestra que no hay errores sistemáticos y se investiga la contribución de los diferentes pasos a la incertidumbre total.

VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO



Ejemplo de validación "hacia atrás"
Determinación de metales pesados en lodos de depuradoras

VALIDACIÓN “hacia atrás” DEL MÉTODO ANALÍTICO

1) Validación de la etapa de detección final

Errores en cálculos sencillos (p.e. concentraciones)

Errores de dilución

Confusiones originadas al utilizar disolventes

Utilización de compuestos impurificados

Contaminaciones, interferencias, patrones inadecuados

Corrección de fondo mal hecha o confianza ciega en sistemas de integración

Mal uso de unidades: 1 g no equivale a 1 mL, confusión en el uso de ppm, ppb, ppt...

Ausencia de igualación de matriz de las disoluciones de calibrado

Deben prepararse disoluciones con concentración exactamente conocida en el analito (utilización de las adecuadas sustancias patrón).

Estas disoluciones (o sus madres) deben almacenarse en adecuadas condiciones y ser manejadas con cuidado para no ser contaminadas. Deben ser reemplazadas de forma regular.

Los errores durante la calibración pueden originar diferencias entre laboratorios de hasta varios órdenes de magnitud.

2) Influencia de la matriz

Se adicionan los otros componentes de la muestra que acompañan al analito.

Este paso es importante en técnicas multielementales, como pueden ser el ICP o la cromatografía, o en el caso de muestras que precisen de pretratamiento (p.e. mineralización)

Después de investigar el efecto de matriz, debe comprobarse que las conclusiones obtenidas en el paso anterior se mantienen.

VALIDACIÓN “hacia atrás” DEL MÉTODO ANALÍTICO

3) Muestras sólidas

Esta etapa (no siempre necesaria) es muy crítica. Deben optimizarse procedimientos de extracción y digestión.

En An. Inorgánico puede validarse frente a una técnica que permita medir los elementos directamente (A. Neutrónica).

En An. orgánico es casi imposible demostrar que todos los compuestos han sido extraídos.

4) Robustez del método

Variaciones pequeñas de los parámetros operacionales del procedimiento no deben afectar a su comportamiento.

- Variaciones de temperatura o humedad
- Cambios en el equipo (Soxhlet, reactores...)
- Cambio de analista
- Variaciones en la matriz de la muestra

5) Puntos de control

Una vez validados todos los pasos, se pueden definir unos puntos de control que permitan comprobar el comportamiento del método durante su uso diario.

Deben estar ligados a pasos sensibles detectados durante la validación. Los resultados de estos puntos deben registrarse de manera que los problemas puedan ser detectados y seguidos.

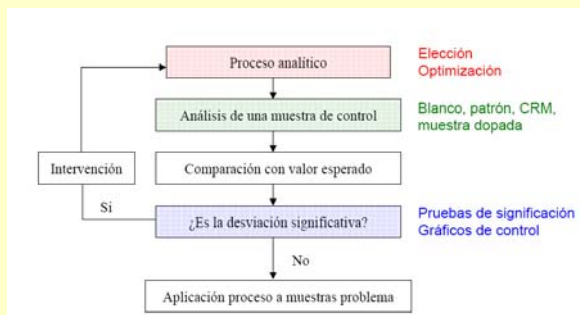
VALIDACIÓN "hacia atrás" DEL MÉTODO ANALÍTICO

6) Gráficos de control

Finalizada la validación, puede comprobarse el comportamiento del método analizando a intervalos regulares de tiempo un MRC. Las fluctuaciones deben ser pequeñas.

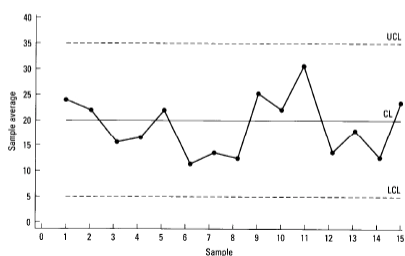
Los gráficos de control permiten la detección de nuevos errores sistemáticos y el seguimiento de la precisión si se hacen medidas replicadas.

Al comienzo del gráfico, se debe determinar a partir de medidas replicadas el valor medio y la desviación típica del método. De esa forma se pueden definir niveles de "aviso" (warning) y "alarma".



1. Tendencias naturales

No se observan tendencias no aleatorias. Proceso bajo control.



Los gráficos de control permiten comprobar si el sistema está bajo control. Hay una serie de reglas acerca de cómo operar cuando el proceso no sigue "el comportamiento normal"

El sobrepasar el nivel de alarma puede implicar tener que revalidar completamente el procedimiento.

Los gráficos más empleados son los de X y los de R

VALIDACIÓN "hacia atrás" DEL MÉTODO ANALÍTICO

6) Gráficos de control

APLICACIÓN DE LOS GRÁFICOS DE CONTROL A LA VALIDACIÓN DE PROCEDIMIENTOS ANALÍTICOS

Resumen

Gráfico de control	Cálculos	Adecuado para detectar	Análisis necesarios
\bar{X}	Valor medio y desviación estándar, límites de control y aviso en el periodo preliminar ($g > 20$)	Errores groseros Errores sistemáticos Errores aleatorios (dispersión de valores individuales). Control de la precisión	Análisis de una muestra de control a intervalos regulares
R	Rango medio y límites de control durante el periodo preliminar	Imprecisión	Al menos $n=2$ para muestras reales a intervalos establecidos, o al principio y final de una serie de análisis
FR	FR medio, desviación estándar y límites de control y aviso en el periodo preliminar. FR se calcula a partir de muestras de control	Inexactitud, errores sistemáticos proporcionales, errores sistemáticos absolutos (si se usa muestra certificada)	Al menos $n=1$ de la muestra (real o de control) no dopada y dopada con una cantidad conocida de analito
Gráfico para blancos	Media y desviación estándar, límites de control y aviso en el periodo preliminar	Control de los valores (señal) del blanco Errores instrumentales Variación en reactivos	Al menos $n=2$ determinaciones del blanco a intervalos regulares
Gráfico Cusum	Valor referencia μ_0 y desviación estándar en el periodo preliminar. Parámetros de máscara V Sumas acumuladas	Inexactitud, desviaciones	Análisis de la muestra de control elegida a intervalos regulares

Materiales de Referencia Certificados

Material de Referencia: Material o sustancia, una o más de cuyas propiedades son suficientemente homogéneas y bien establecidas, como para ser utilizado para calibrar un equipo, comprobar un método de medida o para asignar valores a materiales

Material de Referencia Certificado: Material de Referencia, acompañado de un certificado, uno o más de cuyas propiedades están certificadas por un procedimiento. Este procedimiento permite establecer la trazabilidad del material en términos de unidades SI en los cuales se expresan los valores de esas propiedades (p.e. el mol como unidad SI de cantidad de materia)

Cada valor certificado se acompaña de su incertidumbre a un nivel de confianza dado.

Tipos de materiales de referencia certificados (MRC)

- Sustancias o disoluciones puras para calibración e identificación
- Materiales de matriz conocida para calibración de métodos comparativos
- Materiales de matriz lo más parecida posible a la analizada por el usuario
- Materiales de referencia definidos metodológicamente p.e. biodisponibilidad, lixiviables...
Implican un protocolo muy estricto

Las **sustancias o disoluciones puras** llevan certificadas la máxima concentración de impurezas. Se basan en procedimientos de pesada y en comprobaciones estequiométricas.

Los **MRC de matriz** suelen ser sustancias de origen natural lo más parecidas a muestras reales. La utilización de muestras artificiales o naturales enriquecidas artificialmente (fortalecidas, dopados o en inglés spiked) puede ser peligrosa.

Los MRC se emplean principalmente para demostrar la exactitud y demostrar la trazabilidad de los resultados, primero al MRC y luego a las unidades en que se certifica su contenido.

Buenas prácticas de laboratorio (GLP)

Desarrolladas en 1978 por la US Food and Drug Administration. Hoy día propuestas por otros muchos organismos.

Relacionadas con procesos organizativos y las condiciones bajo las que los estudios de laboratorios se planifican, se llevan a cabo, se siguen, se registran y se comunican.

Toda la información sea trazable y pueda ser encontrada.

Las BPL ó GLP por sí solas no garantizan la calidad de los resultados reales.

Normalización

Una norma es un documento de aplicación voluntaria que contiene especificaciones técnicas basadas en los resultados de la experiencia y del desarrollo tecnológico.

Objetivos de la normalización

- Simplificación, control y unificación de productos y procesos
- Aumentar la relación e intercambio de ideas entre todos los implicados(proveedor/cliente)
- Conseguir rebajar los costes de producción
- Defender los intereses de los consumidores y de la comunidad
- Suprimir las barreras comerciales

Beneficios de la normalización

- Posibilita la disminución de la diversidad y modelos de productos
- Permite reducir costes de fabricación y stocks
- Ayuda a conseguir una mejor gestión de la empresa
- Mejoran el diseño y fabricación de productos y prestación de servicios
- Aumenta la competitividad de la empresa en los mercados nacionales

Normalización

¿Quién las elabora?

Organismos internacionales de normalización:

IEC, Comisión Electrotécnica Internacional: electrotecnia y electrónica
ISO, International Organization for Standardization (www.iso.org)

Organismos europeos de normalización:

Comité Europeo de Normalización (CEN)
Comité Europeo de Normalización Electrotécnica (CENELEC)
Instituto Europeo de Normas de Telecomunicación (ETSI)

AENOR (Asociación Española de Normalización, www.aenor.es) es
Comités Técnicos de Normalización (AEN/CTN)

NORMAS ISO 9000

Estas normas definen las bases de cómo establecer, documentar y mantener un sistema de aseguramiento de la calidad efectivo.

Las series de ISO 9000 constan de modelos que definen los requisitos mínimos específicos para proveedores externos, y guías para el desarrollo de programas internos de calidad. Se

Normas de referencia:

(UNE-EN-)ISO 9000-1: describe cómo deben aplicarse las otras normas

(UNE-EN-) ISO 9004: Incluye información muy útil acerca de la gestión de la calidad

Normas de conformidad:

(UNE-EN-) ISO 9001, 9002 y 9003.

Recogen los requisitos que nuestros clientes exigirán a nuestro sistema de calidad. Se diferencian por el alcance del sistema que definen.

Las empresas pueden utilizar estas normas para obtener un certificado, expedido por un organismo independiente, que atestigua el cumplimiento de los requisitos de la norma por parte del sistema de calidad implantado.

Acreditación

Procedimiento mediante el cual un organismo autorizado reconoce formalmente que una organización es competente para la realización de determinada actividad

Para un laboratorio, el fin último y práctico de asumir un sistema de calidad o norma es conseguir la **acreditación sobre una cierta actividad** (alcance de la acreditación) que garantice formalmente su competencia técnica y la validez de sus resultados, además de mejorar la imagen del laboratorio de cara a sus clientes y de optimizar la gestión de su actividad.

Eso implica que los métodos analíticos deben estar validados y los resultados expresados con su correspondiente incertidumbre

ENAC, Entidad Nacional de Acreditación, es una entidad privada, tutelada por el MEC, independiente y sin ánimo de lucro, que coordina y dirige en el ámbito nacional un Sistema de Acreditación.

ENAC evalúa el cumplimiento de los requisitos establecidos en las siguientes Normas Internacionales :

UNE-EN ISO-17025:2005 (antes EN 45001) para Laboratorios de Ensayo y Calibración.

EN 45004 (ISO / IEC 17020) para Entidades de Inspección.

EN 45011 (ISO / IEC Guide 65) para Entidades de Certificación de Productos.

EN 45012 (ISO / IEC Guide 62) para Entidades de Certificación de Sistemas de la Calidad y de Sistemas de Gestión Medioambiental.

EN 45013 para Entidades de Certificación de Personas.

Reglamento CEE 1836/93 para Verificadores Medioambientales (sistema comunitario de ecogestión y ecoauditoría).

Real Decreto 1369/2000 de Buenas Prácticas de Laboratorio, para Entidades que realizan estudios de productos fitosanitarios