



Instituto
Nacional
de Tecnología
Industrial

Ministerio de Producción
Secretaría de Industria, Comercio
y de la Pequeña y Mediana Empresa



Requerimientos sobre Validación de Métodos en el marco de la Acreditación de Laboratorios según la norma ISO 17025

Disertante:
Lic. Pablo Álvarez
Calidad y Competitividad
INTI-Química



Guías de referencia

EURACHEM

www.eurachem.org

**The Fitness for Purpose of Analytical Methods - A
Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics
(1998)**

**Guide to Quality in Analytical Chemistry – An Aid to
Accreditation (2002)**

**Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement -
2nd Edition (2000)**

Guías de referencia

IUPAC

www.iupac.org

**Harmonized Guidelines for Single-Laboratory
Validation of Methods of Analysis - 2002**

**Nomenclature in Evaluation of Analytical Methods
including Detection and Quantification Capabilities
(IUPAC Recommendations 1995)**

Guías de referencia

ICH

www.ich.org

**Validation of Analytical Procedures:
Text and Methodology – Q2(R1) - 2005**

¿Qué es validar?

Definición:

ISO/IEC 17025:2005

Confirmación, mediante el examen y el aporte de evidencias objetivas, de que se cumplen los requisitos particulares para un uso específico previsto.

¿Qué se puede validar?

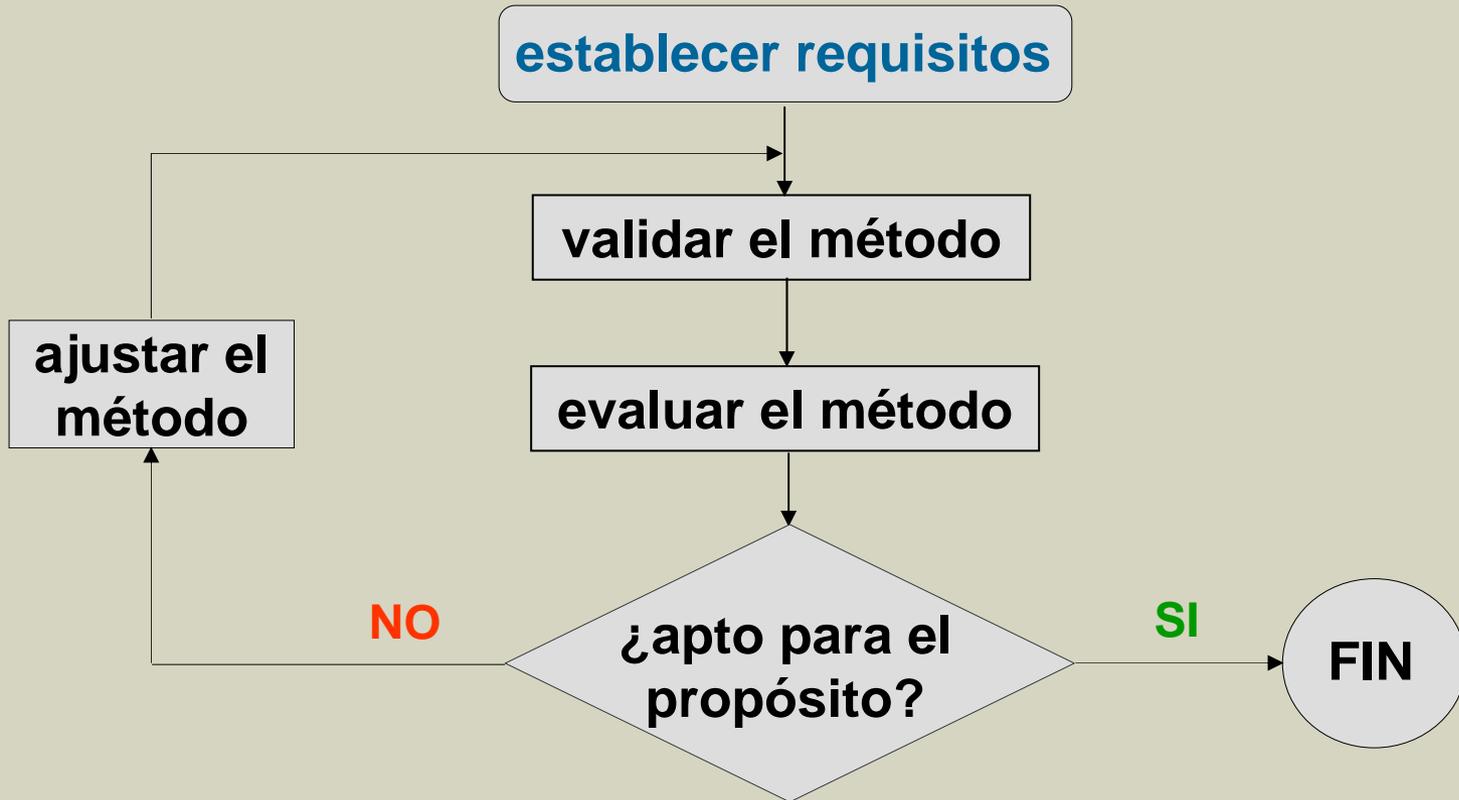
- **Métodos analíticos**
- **Métodos de control de limpieza**
- **Equipos e instalaciones**
- **Procesos**
- **Programas de computación**
- **Personal**

¿Cómo se valida un método de ensayo?

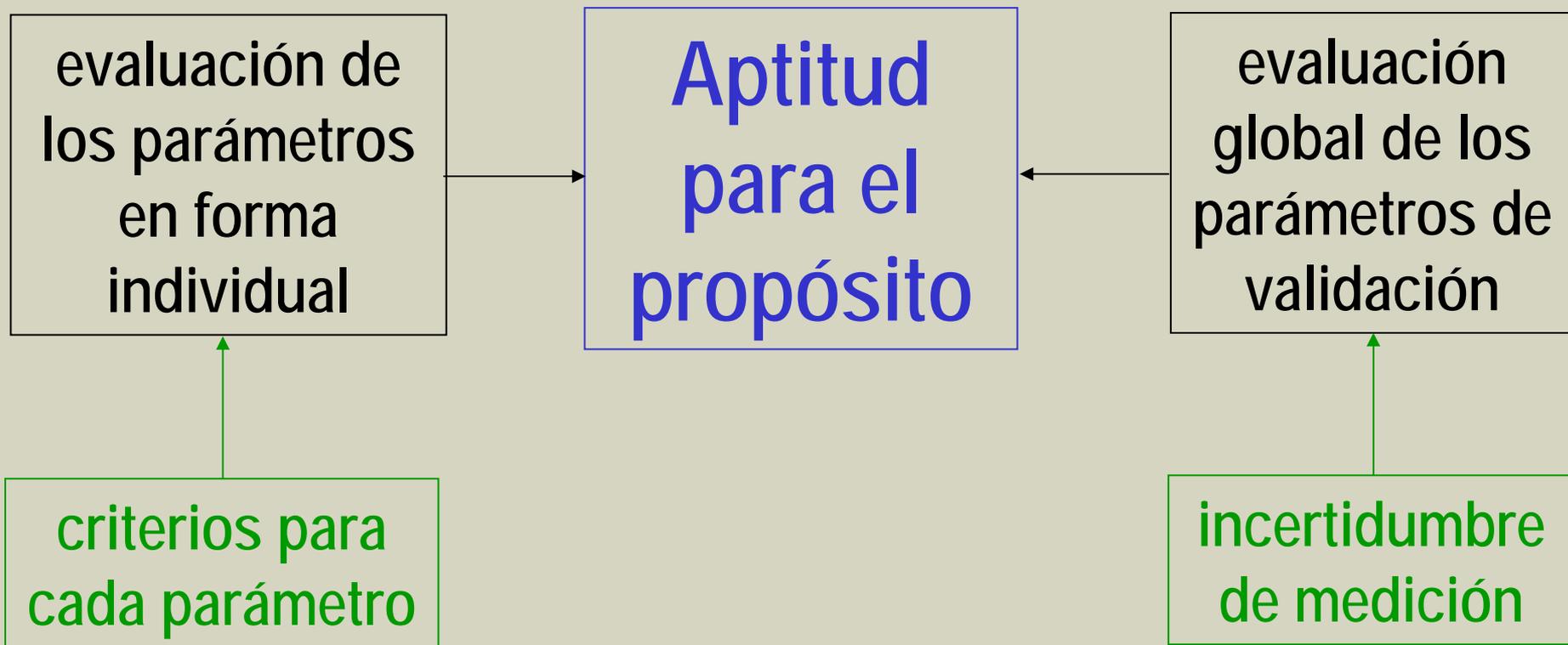
Existen dos formas de validar un método de ensayo:

- **Estudio colaborativo**
“Collaborative study”
- **Un solo laboratorio**
“In-house validation”
“Single-laboratory validation”

¿Cómo se valida un método de ensayo?



¿Cómo se valida un método de ensayo?



Parámetros típicos de validación

- **Selectividad (Especificidad)**
- **Linealidad**
- **Límite de Detección**
- **Límite de Cuantificación**
- **Precisión**
- **Veracidad (Exactitud)**
- **Rango**
- **Robustez**
- **Incertidumbre de Medición**

Selectividad

Definición

IUPAC

Capacidad de un método para cuantificar exactamente un analito en presencia de interferencias

Selectividad

¿Qué es una interferencia?

Una interferencia es aquella especie química que causa un error sistemático en la determinación de un analito.

Se pueden dar dos casos:

- ✓ **la presencia de interferencias que puedan dar una respuesta analítica que no se diferencie de la respuesta del analito.**
- ✓ **la presencia de interferencias que afecten la señal del analito (“efecto matriz”)**

Selectividad

¿Cómo se evalúa?

Análisis simultáneo de:

- Un blanco de reactivos
- Una matriz natural o sintética libre de analito
- Analito en un solvente adecuado
- La misma matriz con el agregado de una cantidad conocida de analito o una muestra real
- Potenciales interferencias en presencia de analito

Linealidad

Definición

ICH

Capacidad de un método analítico de producir resultados que sean directamente, o por medio de una transformación matemática definida, proporcionales a la concentración de analito en la muestra.

Linealidad

Recomendaciones

- **Cantidad de puntos: ≥ 6 concentraciones**
- **Igualmente espaciados**
- **Cantidad de replicados por concentración: ≥ 3**
- **Replicados independientes**
- **Usando analito puro o analito en matriz**
- **Medidos aleatoriamente**

Linealidad

Evaluación

- Evaluación visual
- Evaluación estadística (cuadrados mínimos)
- Gráfico de los residuos
- Coeficiente de correlación (R)
- Ordenada al origen y pendiente

Linealidad

Evaluación

A partir de la información obtenida en la evaluación de la linealidad, se determinará la estrategia a utilizar en el método de rutina. Puede ser que sólo sea necesario calibrar con un punto o tal vez con dos puntos. En otros casos será necesario calibrar con varios puntos.

Es importante tener en cuenta que los siguientes parámetros de validación, en particular la precisión y la veracidad, sean evaluados utilizando la estrategia de calibración que se usará en el procedimiento elegido.

Límites de Detección y de Cuantificación

Definiciones

EURACHEM

L_D :

Menor concentración de analito en una muestra de ensayo que puede ser confiablemente distinguida del blanco.

L_Q :

Menor concentración de analito en una muestra que puede ser determinada con un aceptable nivel de incertidumbre.

Límites de Detección y de Cuantificación

Métodos de determinación

Si bien existen diferentes metodologías para calcular los límites de detección y cuantificación, la más utilizada es la siguiente:

$$L_D = 3 \cdot s$$

$$L_Q = 10 \cdot s$$

s = desviación estándar de un blanco o de una muestra fortificada a baja concentración

Límites de Detección y de Cuantificación

IMPORTANTE

Quando sea necesario establecer la posible presencia o ausencia de un componente en una muestra, el resultado del ensayo nunca deberá contrastarse con el límite de detección (L_D).

En este caso, el parámetro indicado es el llamado *Límite o Nivel crítico* (L_c).

Además, se recomienda informar “no detectado” y evitar hacer declaraciones como “ausente”, “ausencia” o “no contiene”.

Errores aleatorios y sistemáticos

Definiciones (VIM 2008)

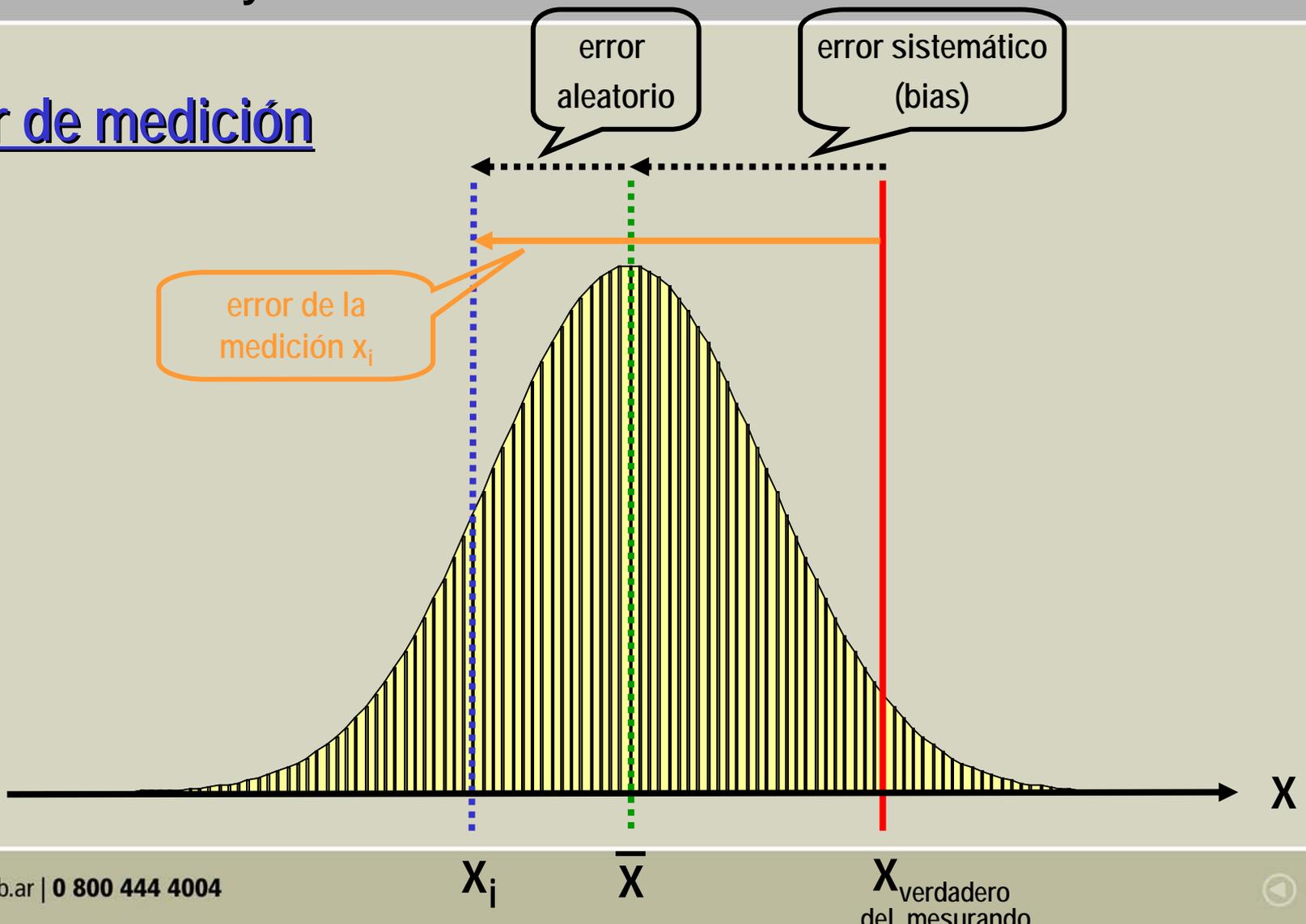
error de medición: diferencia entre el resultado de una medición y un valor de referencia.

error aleatorio: componente del error de medición que, en mediciones repetidas, varía de forma impredecible.

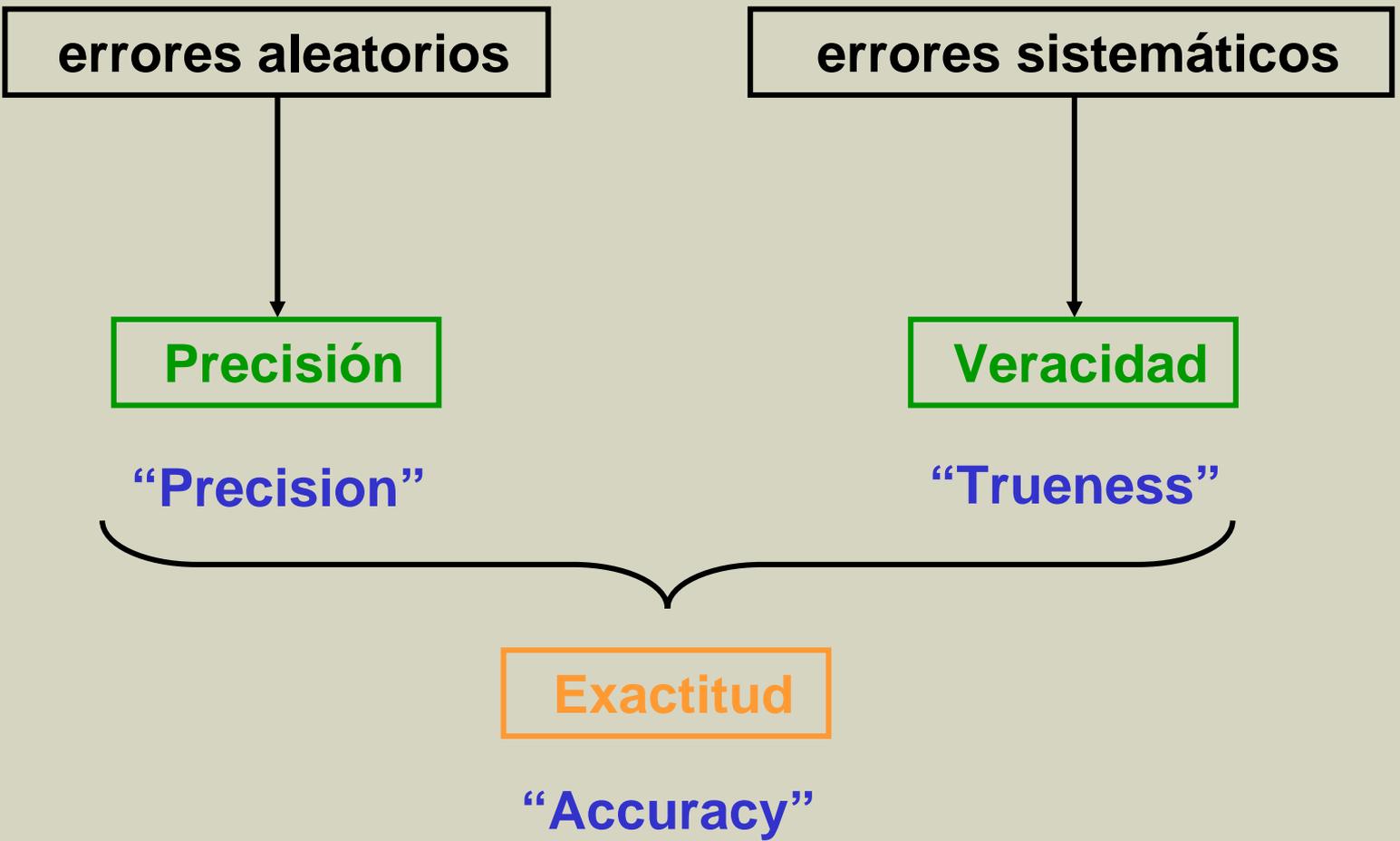
error sistemático: componente del error de medición que, en mediciones repetidas, permanece constante o varía de forma predecible.

Errores aleatorios y sistemáticos

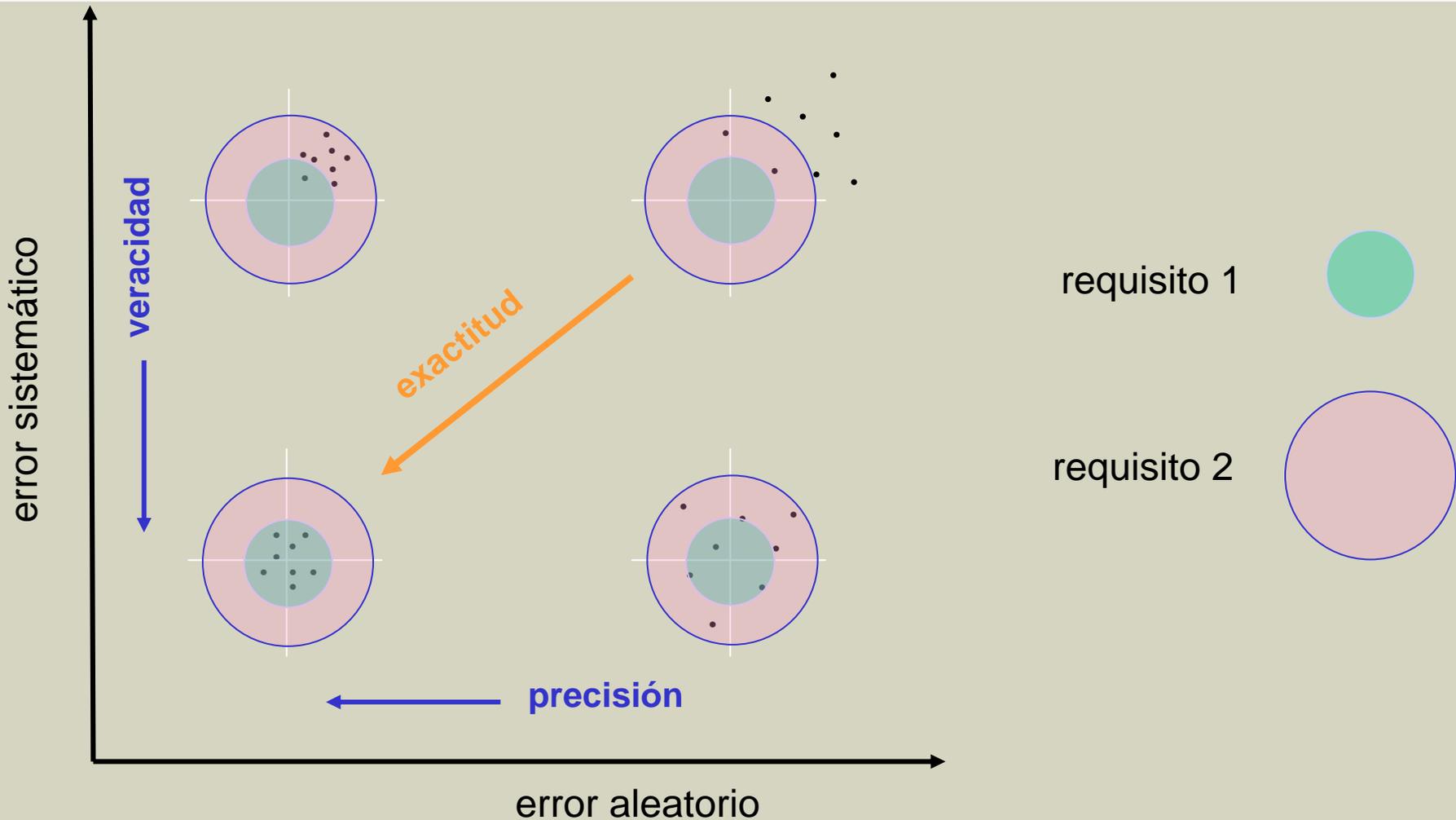
Error de medición



Errores aleatorios y sistemáticos



Errores aleatorios y sistemáticos



Precisión

Definición

VIM 2008

Grado de concordancia entre resultados obtenidos en mediciones repetidas de un mismo objeto o de objetos similares, bajo condiciones especificadas

Precisión

Diferentes condiciones

- **Repetibilidad**
- **Precisión intermedia**
- **Reproducibilidad**

Precisión

Evaluación

La precisión de un método de ensayo se expresa cuantitativamente como “imprecisión” a través del cálculo de la desviación estándar de una serie de resultados (s).

En una validación es conveniente evaluar la precisión tanto en condiciones de repetibilidad como de precisión intermedia.

Si el rango del método es amplio deberá evaluarse la precisión para distintos valores dentro del rango.

Veracidad (trueness)

Definición

VIM 2008

Grado de concordancia entre el promedio de un número infinito de resultados y un valor de referencia.

Veracidad (trueness)

¿Cómo se evalúa?

A través de la medición del **sesgo** (bias), el cual se puede expresar como:

Diferencia

$$\delta = \bar{x}_{\text{obs}} - x_{\text{ref}}$$

Recuperación

$$\% R = \frac{\bar{x}_{\text{obs}}}{x_{\text{ref}}} \times 100$$

x_{ref} = valor de referencia \bar{x}_{obs} = valor medio observado

Veracidad (trueness)

¿Cómo se evalúa?

Analizar varias veces un material de referencia certificado (MRC) o una muestra/matriz fortificada dentro del rango del método.

También puede evaluarse la veracidad comparando el método con otro previamente validado o con un método primario.

En cualquier caso conviene llevar a cabo algún test estadístico para evaluar si existen diferencias estadísticamente significativas.

Rango

Definición

IUPAC

Intervalo de concentraciones de analito dentro del cual se puede considerar al método validado

Rango

No hay criterio unificado con respecto al sentido de este parámetro; mientras algunos hacen referencia al *rango lineal*, otros hablan de *rango de trabajo*, pero lo más importante en una validación es establecer el rango de concentraciones de analito en la muestra para el cual el método está validado.

Robustez

Definición

ICH

La robustez de un procedimiento analítico es una medida de su capacidad para mantenerse sin cambios ante pequeñas pero deliberadas variaciones en los parámetros del método, que provee una indicación de su confiabilidad durante el uso normal.

Robustez

¿Cómo se evalúa?

Se desafía al método realizando variaciones tanto en la preparación de la muestra como en la determinación analítica.

Se estudia el efecto de tales variaciones sobre los parámetros previamente validados, en particular sobre la precisión y veracidad del método.

Gran parte de esta información proviene del desarrollo del método.

Incertidumbre

Definición

GUM

Parámetro, asociado con el resultado de una medición, que caracteriza la dispersión de los valores que podrían ser razonablemente atribuidos al mesurando.

Incertidumbre

La incertidumbre puede evaluarse a partir de la información obtenida en una validación, en particular a partir de la precisión intermedia y de la veracidad del método. (ver guías Eurachem 2nd ed. - 2000 y Eurolab Technical Report N°1/2007)

www.eurachem.org

www.eurolab.org

Dependiendo de los criterios establecidos previamente a la validación, este parámetro puede servir para establecer el “fitness for purpose” del método analítico.

Requisito normativo

ISO/IEC 17025:2005

Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración

5.4.5.2 Validación de los métodos

El laboratorio debe validar los métodos no normalizados, los métodos que diseña o desarrolla, métodos normalizados empleados fuera del alcance previsto, así como las ampliaciones y modificaciones de los métodos normalizados, para confirmar que los métodos son aptos para el fin previsto.

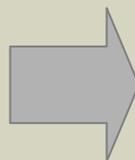
Requisito normativo

ISO/IEC 17025:2005

Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración

5.4.2 Selección de los métodos

... El laboratorio debe confirmar que puede aplicar correctamente los métodos normalizados antes de utilizarlos para los ensayos. Si el método normalizado cambia, se debe repetir la confirmación...



**verificación del
método**

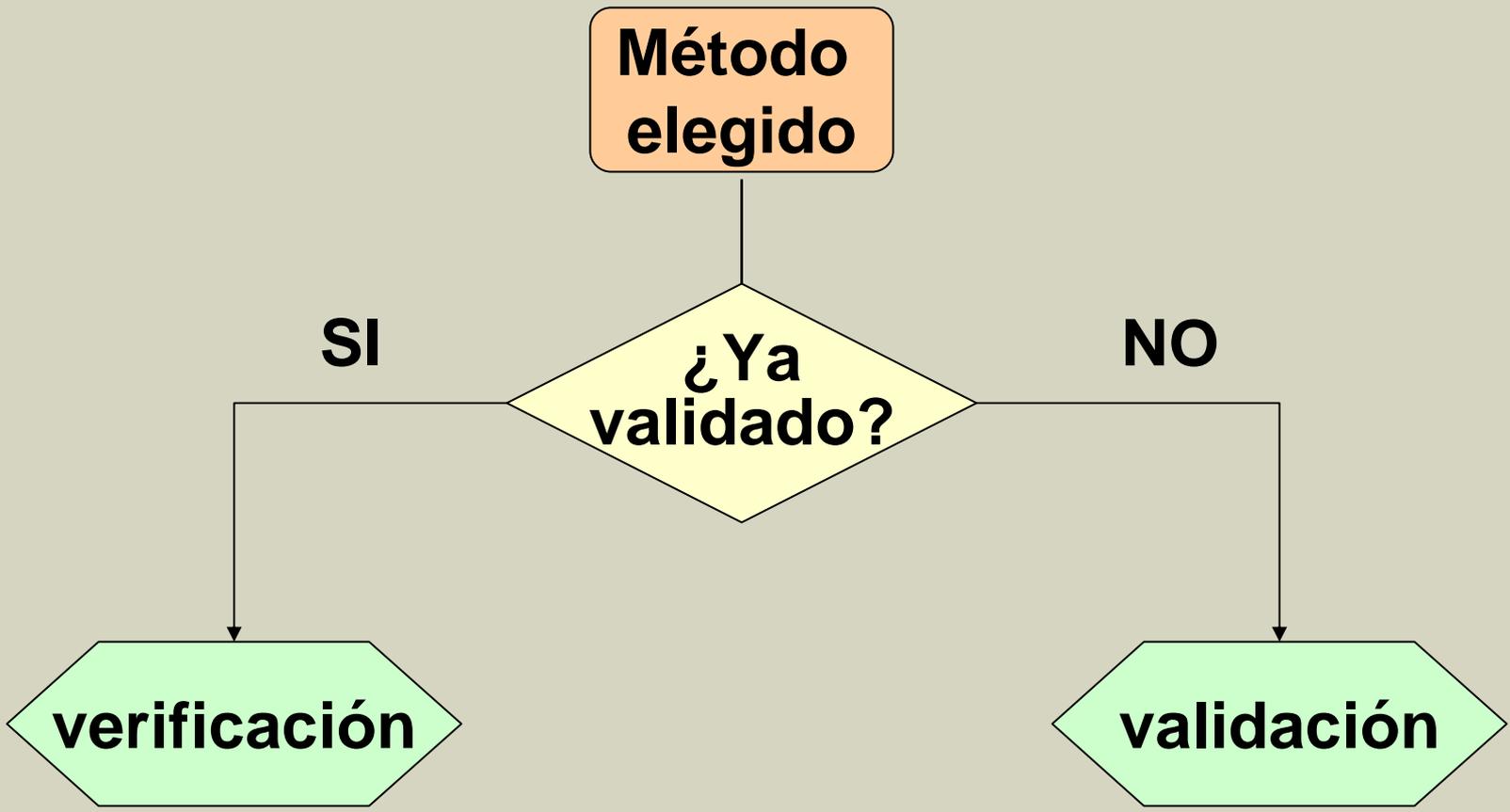
Requisito normativo

¿Qué es la verificación de un método?

La verificación de un método es el proceso de asegurar que los parámetros de performance del método, previamente establecidos, pueden ser alcanzados por el laboratorio.

Los parámetros que típicamente se verifican, son la precisión y la veracidad (*trueness*) del método. En algunos casos puede ser necesario verificar también algún otro parámetro, por ejemplo, el límite de detección o la linealidad.

Requisito normativo



Criterios del Organismo Argentino de Acreditación (OAA)

Guía para Validación de Métodos de Ensayo del OAA

Habitualmente los organismos de acreditación establecen los requisitos indicados en las normas de referencia y además suelen agregar requerimientos propios.

La Guía para Validación de Métodos de Ensayo (DC-LE-05) del OAA establece los criterios de dicho organismo con respecto al grado de validación requerido para los métodos, en función de sus características.

Criterios del Organismo Argentino de Acreditación (OAA)

Etapas del proceso de validación

La guía establece que la validación es un proceso de tres etapas:

- 1. establecimiento de los requisitos a cumplir, ya sea para los parámetros de validación en forma individual o conjunta.**
- 2. determinación de los parámetros de validación.**
- 3. evaluación de los resultados obtenidos para los parámetros validados comparados con los requisitos establecidos previamente.**

Criterios del Organismo Argentino de Acreditación (OAA)

Tipos de métodos

La guía también establece el alcance de la validación dependiendo de las características del método:

- 1. *método normalizado***, ejecutado tal y como se establece en el documento.
- 2. *método normalizado modificado***, en el cual se hayan realizado cambios que puedan tener repercusión sobre la calidad de los resultados; por ejemplo cambio en la metodología de extracción, cambio en la matriz, extensión del rango, equipamiento nuevo, etc.
- 3. *método interno***, elaborado por el laboratorio o sacado de la bibliografía pero sin datos de performance del método.

Criterios del Organismo Argentino de Acreditación (OAA)

Método normalizado

Un método normalizado, en general, está totalmente validado y por lo tanto el laboratorio, para demostrar que lo ejecuta correctamente, sólo deberá *verificarlo*. Esto significa que deberá demostrar que puede alcanzar la performance adecuada para ciertos parámetros de validación.

Si bien no se pueden establecer criterios rígidos con respecto a qué parámetros verificar, es habitual que se controlen la precisión y la veracidad, en particular cuando estos parámetros están indicados en las normas de referencia.

También se puede confirmar el método a través de la participación en ensayos de aptitud y/o la elaboración de gráficos de control.

Criterios del Organismo Argentino de Acreditación (OAA)

Método normalizado

En el marco de la acreditación de laboratorios se consideran métodos “normalizados” a:

- ✓ métodos publicados por organismos de normalización internacionales, regionales o nacionales, ej.:

ISO, EN, NM, ASTM, BS, DIN, IRAM, etc.

- ✓ métodos publicados por organizaciones reconocidas en diferentes ámbitos, ej:

AOAC, FIL-IDF, EPA, SMW&W, USP, etc.

Criterios del Organismo Argentino de Acreditación (OAA)

Método normalizado modificado

Los métodos normalizados que han sido modificados deben ser validados de tal forma de evaluar qué incidencia tienen los cambios realizados sobre los distintos parámetros de validación.

El laboratorio debe tener la competencia para evaluar qué parámetros deberían revalidarse en función de los cambios realizados.

Por ejemplos, cambios en el método de extracción podrían afectar la selectividad por la posible presencia de interferencias y también podría afectar la veracidad.

Criterios del Organismo Argentino de Acreditación (OAA)

Método normalizado modificado

Otros ejemplos:

Modificación	Posible efecto sobre...
tipo de matriz	selectividad, veracidad, LD, LQ
extensión del rango	linealidad, precisión
cambio de analista	precisión, veracidad
sistema de detección	selectividad, linealidad; LD

Criterios del Organismo Argentino de Acreditación (OAA)

Método interno

Los métodos desarrollados internamente o los métodos obtenidos de bibliografía que no presenten valores de performance declarados, deberán ser validados completamente.

El grado de validación y los parámetros a evaluar dependerán de cada método.

En la tabla siguiente se pueden observar algunos ejemplos:

Requerimientos sobre Validación de Métodos en el marco de la Acreditación de Laboratorios según la norma ISO 17025

Criterios del Organismo Argentino de Acreditación (OAA)

	Método Cualitativo	Análisis de trazas	Comp. mayoritario	Físico- químico
Selectividad				-
Linealidad	-		depende	depende
Límite de detección			-	-
Límite de cuantificación	-		-	-
Precisión	-			
Veracidad	-			
Rango	-			
Robustez				
Incertidumbre	-			

Criterios del Organismo Argentino de Acreditación (OAA)

Informe de validación

Un informe de validación, típicamente, debe contener la siguiente información:

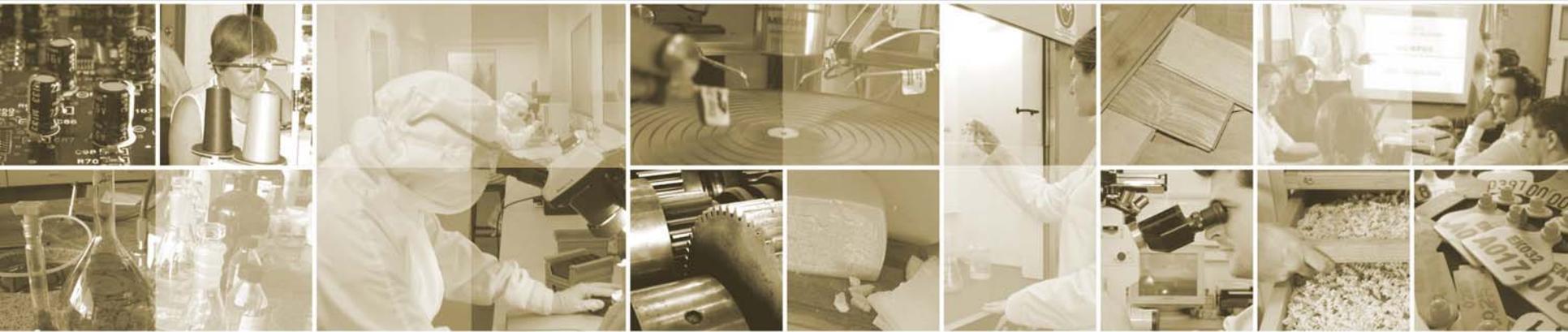
- **Objetivo y alcance (matrices, concentraciones)**
- **Instrumentación y materiales utilizados**
- **Personal involucrado**
- **Protocolo de validación**
- **Resultados y conclusiones**
- **Procedimiento de ensayo**
- **Firma del/de los responsable/s de la aprobación**



INTI

Instituto
Nacional
de Tecnología
Industrial

Ministerio de Producción
Secretaría de Industria, Comercio
y de la Pequeña y Mediana Empresa



Muchas gracias por su atención!

