

# VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS DE LABORATORIO

GLORIA INÉS GIRALDO GÓMEZ\*

## RESUMEN

En este artículo se presentan los principales parámetros que se deben determinar para llegar a validar una técnica analítica, de tal forma que a través de ella se generen resultados confiables.

### Generalidades

El objetivo principal de cualquier laboratorio de análisis es la producción de resultados de alta calidad, a través del uso de medidas analíticas que sean confiables, y adecuadas para el propósito propuesto.

La confiabilidad de un resultado se mide por la precisión y la exactitud, parámetros que se ven afectados por todas las variables que intervienen en el proceso de medición, tales como técnicas de muestreo, condiciones ambientales, personal que realiza el análisis, equipos utilizados, calidad de los reactivos y procedimiento utilizado para su medición.

El protocolo de todos los pasos y condiciones que se deben seguir para llegar al resultado constituye el método de análisis, y este debe ser validado.

Un sistema analítico es definido como una cadena de información que va desde el conocimiento del material que se analiza hasta la interpretación de los resultados obtenidos. En cualquier momento del análisis se pueden cometer errores muy significativos. Para prevenir dichos errores es importante identificar los puntos críticos y controlarlos paso a paso a lo largo de todas las etapas del proceso de medición.

El sistema analítico puede considerarse dividido en tres etapas:

- Operaciones previas: muestreo, disolución, separación, reacciones analíticas.

---

\* Universidad Nacional de Colombia Sede Manizales.

- Medición y traducción de la señal analítica, es decir, el uso de instrumentos que genera la información.
- Toma y tratamiento de datos<sup>[1]</sup>

Los resultados generados en un sistema analítico, solo son confiables en la medida en que el método bajo el cual se obtuvieron las mediciones, haya sido sometido previamente a un proceso de validación

### **Qué es una medición?**

Es la asignación de un valor numérico a objetos o eventos de acuerdo a reglas específicas.

En el contexto de la ciencia y la tecnología, los objetos/eventos son propiedades, mientras que las reglas dependen de principios científicos<sup>[2]</sup>

### **Validación**

Es un plan establecido por medio del cual se puede determinar la exactitud, precisión, linealidad, error sistemático, robustez/rigurosidad, sensibilidad, límite de detección y cuantificación de un método de análisis<sup>[3]</sup>

Según el tipo de procedimiento los diferentes métodos analíticos se clasifican en:

- **Métodos absolutos:** La medida física se relaciona directamente con la cantidad de materia. Ej: las gravimetrías.
- **Métodos estequiométricos:** La calibración de un reactivo permite relacionar la cantidad patrón con la cantidad del analito, por mecanismos químicos. Ej: las volumetrías.
- **Métodos comparativos:** Son aquellos en los cuales los valores obtenidos en las mismas condiciones experimentales, para una serie de patrones y de muestras, se relacionan entre sí a través de un factor o una función de calibración, un ejemplo de estos son la mayoría de las técnicas instrumentales<sup>[1]</sup>.

### **Principios de la validación**

De acuerdo al método de ensayo que se esté validando; volumétrico, gravimétrico, instrumental, se debe establecer una metodología específica para encontrar los parámetros que se requieran.

En general una metodología para validar técnicas analíticas comprende:

Uso de un patrón primario para asegurar la exactitud.

A través de una evaluación estadística de los resultados de ensayos múltiples de una serie de patrones con sus respectivas réplicas, se determina la precisión y la reproducibilidad.

Variando la concentración del analito, a través del tamaño de la muestra se determina la linealidad

Si los resultados no muestran desviaciones para ensayos hechos por diferentes analistas, en diferentes días, con diferentes condiciones ambientales, estudiando el efecto de matriz, se considera que el método tiene una buena robustez/rigurosidad

La mínima cantidad de muestra que puede ser analizada con buena precisión se considera el límite de cuantificación<sup>[3]</sup>.

El valor de los parámetros estadísticos dentro de los cuales se puede establecer la validez de un resultado, se fijan de acuerdo a los criterios específicos para cada caso en particular, dependiendo del tipo de muestra y el fin que se busca con los resultados.

## Determinación de los parámetros

**Precisión:** Es la medida del grado de concordancia entre análisis repetidos de una muestra,<sup>[4]</sup> La precisión se expresa por lo general en términos de la desviación estándar, desviación estándar relativa, el coeficiente de variación o el rango<sup>[8]</sup>.

La desviación estándar y la desviación estándar relativa, se calculan mediante las siguientes expresiones:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n - 1}}$$

$s$  = Desviación estándar

$n$  = Número de medidas

$X_i$  = Valor medido

$\bar{X}$  = Estimador de la medida poblacional

### Desviación estándar relativa (RSD)

$$RSD = \frac{s}{\bar{X}} \times 100$$

Ambos estimadores, desviación estándar y coeficiente de variación permiten evaluar la incertidumbre de la medida. (Error aleatorio correspondiente a la dispersión de los datos alrededor del valor medio).<sup>[7]</sup>

El criterio de aceptación puede ser variable y está fijado por los objetivos buscados, por ejemplo un laboratorio tiene establecido un RSD no mayor del 2% para el análisis de metanol en muestras de alcohol por cromatografía de gases, inyectando 5 veces un solución estándar<sup>[7]</sup>.

**Exactitud:** También conocida como error sistemático o tendencia<sup>[7]</sup>. Es una combinación del sesgo y la precisión de un procedimiento analítico, que refleja la proximidad de un valor medido a un valor verdadero.<sup>[4]</sup> Para su determinación se requiere utilizar una muestra patrón.

El error sistemático es un error determinado, por lo general es unidireccional con respecto al valor verdadero, es casi constante en una serie de análisis, sin considerar el tamaño de la muestra, por ejemplo el volumen consumido por una prueba en blanco, que no se corrige durante una serie de titulaciones. La significancia de un error constante generalmente disminuye al aumentar el tamaño de la muestra.<sup>[8]</sup>

Matemáticamente suele expresarse de los siguientes modos:

$$\text{Desviación: } B = \bar{X} - \hat{X}$$

$$\text{Desviación relativa: } B\% = \frac{B}{\bar{X}} \times 100$$

$$\text{Recuperación: } R = \frac{\bar{X}}{\hat{X}} \times 100$$

$\bar{X}$  es el valor medio y  $\hat{X}$  es el valor verdadero.

De todas la más utilizada es la recuperación. Esta debe aproximarse al 100%. En el análisis de trazas no siempre se alcanzan recuperaciones tan elevadas y se considera habituales recuperaciones entre el 60 y 80% .<sup>[7]</sup>

**Error total:** es la combinación entre los errores aleatorios y sistemáticos. Se determina a través del análisis de varianza, por medio de este se aíslan y estiman las variaciones que contribuyen al error total de la medición.<sup>[5]</sup>

Con el análisis de varianza se separan (matemáticamente) la variación total de las mediciones en partes, así que una parte representa y da un estimado de la varianza asociada con el error experimental, mientras la otra parte puede ser asociada con factores estudiados por separado y pueden ser presentada como estimados de varianza, La relación entre las dos varianzas es conocida como factor F (De la distribución Fischer), el cual se compara con los valores críticos de la distribución F que se encuentran en las tablas.<sup>[2]</sup>

## **Linealidad**

La linealidad de un método se refiere a la proporcionalidad entre la concentración del analito y su respuesta.<sup>[7]</sup> Por ejemplo en una técnica gravimétrica a mayor concentración de analito, el peso del precipitado debe aumentar en forma proporcional.

Para su determinación, según la técnica que se está validando, se modifica el tamaño de la muestra y se hace la medición correspondiente. Mediante la técnica de regresión lineal, se busca la ecuación de la recta que relacione el tamaño de la muestra con el resultado, de tal forma que se establezca una ecuación de la forma  $y=mx+b$ , el valor de  $y$  corresponde al valor de la medición (Volumen de titulante, cantidad de precipitado, absorbancia, etc.) y el valor de  $x$  al tamaño de la muestra,  $m$  el valor de la pendiente y  $b$  el intercepto en el origen. Se determina el coeficiente de correlación  $r$  para evaluar el ajuste al modelo lineal propuesto, los valores por encima del 99.5 indican una buena linealidad del método.<sup>[3]</sup>

La técnica de regresión también se utiliza como una forma de determinar el error sistemático de un método de análisis, ya que cuando se analiza un blanco de reactivos (tamaño de la muestra cero), el resultado del ensayo debe ser cero, por lo tanto un valor de  $b$  (en la ecuación de regresión) diferente de cero, indica un error constante en las mediciones.<sup>[3]</sup>

En el siguiente ejemplo se muestra como se determinó la linealidad y el error sistemático de un método gravimétrico para el análisis de plata en una aleación:

Se hicieron varias mediciones, variando el tamaño de la muestra, como se muestra en la tabla 1, se gráfico el peso del precipitado vs el tamaño de la muestra (gráfico 1).

Se estableció la ecuación de regresión:  $y=0.20x-0.002$

El coeficiente de correlación  $r$  fue del 99.9% el cual indica una buena linealidad del método.

El valor de  $b$ , de  $-0.002$  indica un error de 2 mg, en cada determinación, este valor debe ser tenido en cuenta para el calculo del resultado final. A medida que aumenta el tamaño de la muestra este valor es menos significativo

| Peso de muestra<br>gr | Peso de Precipitado<br>gr |
|-----------------------|---------------------------|
| 0.2000                | 0.0378                    |
| 0.5000                | 0.0979                    |
| 1.0000                | 0.1981                    |
| 2.0000                | 0.3982                    |
| 5.0000                | 0.9980                    |

Tabla 1

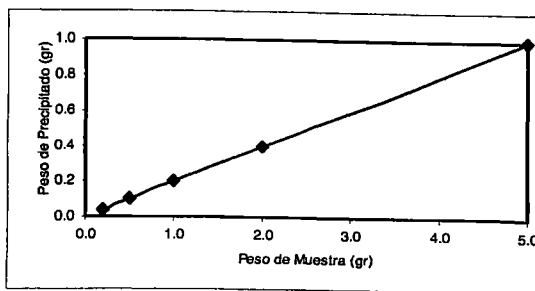


Gráfico 1

## Sensibilidad

La sensibilidad de un método analítico corresponde a la mínima cantidad del analito que puede producir un resultado significativo.<sup>[7]</sup>

Los parámetros para evaluar la sensibilidad son los límites de detección y cuantificación.

**Límite de detección:** Corresponde a la menor concentración del analito que puede detectarse, pero no necesariamente cuantificarse, en una muestra, en las condiciones establecidas. Se expresa en unidades de concentración.

**Límite de cuantificación:** Corresponde a la menor concentración del analito que puede determinarse con precisión y exactitud razonables de acuerdo al tipo de determinación, también se expresa en unidades de concentración.<sup>[7]</sup> El límite de detección se considera como la concentración típica que produce una señal 10 veces superior a la desviación estándar del blanco.<sup>[4]</sup>

La literatura reporta diferentes métodos para establecer la sensibilidad, la siguiente es la metodología reportada por el Water Research Center:<sup>[4]</sup>

"El fundamento para establecer los límites de detección es la variabilidad de la medición del blanco. Con el fin de realizar el cálculo, la variabilidad se mide como la desviación estándar dentro de un lote. Generalmente una mejor estimación de la desviación se obtiene por medio de la combinación de las desviaciones estándar que se obtuvieron a partir de las mediciones del blanco por duplicado de varios grupos".

La desviación estándar combinada se calcula con la siguiente fórmula:

$$S_{dh} = \sqrt{\frac{\sum di^2}{2m}}$$

$S_{ab}$  = Desviación estándar del blanco.

$Di$  = Diferencia entre las determinaciones del blanco dentro de un mismo grupo

$m$  = Número de determinaciones del blanco duplicadas.

Para calcular el límite de detección se utiliza siguiente fórmula

$$L = 2.83 \times t_{0.05} \times S_{dh}$$

$L$  = Límite de detección

$t_{0.05}$  = Valor de las tablas  $t$  de student para prueba de una cola<sup>[5]</sup>

El límite de cuantificación se obtiene multiplicando por 10 la desviación estándar del blanco.<sup>[7]</sup>

## Rigurosidad

Estabilidad de los resultados obtenidos bajo condiciones experimentales no regulares, tales como diferentes matrices, cambios de las condiciones ambientales, Para determinar la rigurosidad de un método las muestras se analizan bajo condiciones regulares e irregulares.<sup>[3]</sup>

Cuando se realiza de forma correcta un examen de rigurosidad este señalará las fases del procedimiento donde es necesario mantener condiciones estrictas; y en cuales se admite cierto grado de flexibilidad.<sup>[4]</sup>

El análisis de la rigurosidad del método se puede determinar a través de un diseño experimental, y con un análisis multifactorial determinar si hay diferencias entre los resultados obtenidos bajo las condiciones irregulares y los que se obtienen bajo las regulares

## **BIBLIOGRAFÍA**

1. GRAS, NURY. Control y Garantía de calidad en Laboratorios Analíticos. Documento Internet. Chile, 1999
2. WERNIMONT, T GRANT. Use of Statistics to Develop, and Evaluate Analytical Methods., Virginia, 1990.
3. METTLER TOLEDO. Validation of Titration Methods.
4. APHA, AWWA, WOCF. Métodos Normalizados para el análisis de aguas potables y residuales, Ediciones Diaz de Santos. España, 1992
5. CASTRO, DE ESPARZA MARIA LUISA. Programa de Mejoramiento de calidad analítica de los laboratorios de la región. Centro Panamericano de Ingeniería Sanitaria y Ciencias del Ambiente. Lima, Perú 1994.
6. ASTM. Annual Book of ASTM Standards. Editorias Staff, 1984.
7. QUATROCCHI. OSCAR ALBERTO y otros, Introducción la al HPLC. Aplicación y Práctica. Artes Gráficas Farro. S.A . Buenos Aires, Argentina. 1992
8. DAY, R,A y Underwod, A.L, Química Analítica Cuantitativa. Prentice Hall Hispanoamericana S.A. Méjico. 1989.