

- **ESTANDARIZACIÓN DE
METODOLOGÍAS**

**ANALÍTICAS EN EL LABORATORIO
DE SALUD PÚBLICA**



AUTOR

JUAN VICENTE GÓMEZ GRANADOS

Ingeniero Químico

Tel. 527 08 42

COLABORADORES

ELVIRA BONILLA

*Ingeniera química. Especialista en análisis químico instrumental
(aebonilla@saludcapital.gov.co)*

IGNACIA ESPINOSA

*Química farmacéutica. Especialista en análisis químico instrumental
(iiespinosa@saludcapital.gov.co)*

FABIO SALAZAR

Químico Farmacéutico (fsalazar@saludcapital.gov.co)

ALEXIS SÁNCHEZ

Ingeniero de alimentos (asanchez@saludcapital.gov.co)

NUBIA MARTÍNEZ

Química (dnmartinez@saludcapital.gov.co)

CONSTANZA RODRÍGUEZ

Química (fcrodriguez@saludcapital.gov.co)

RESUMEN

OBJETIVO

Planear, diseñar y ejecutar la estandarización de las metodologías analíticas cuyo montaje se ha realizado con anterioridad.

MÉTODOS

Una vez establecido el método de ensayo se realiza un análisis preliminar de reproducibilidad y un análisis de interferencia por matriz, para luego realizar la validación y calcular los atributos del método.

RESULTADOS

En el Laboratorio de Salud Pública se estandarizaron trece métodos analíticos a los cuales se les calcularon los atributos de: límite de detección, límite de cuantificación, exactitud, precisión, sensibilidad y rango útil.

CONCLUSIONES

Se determinó la alta confiabilidad de las pruebas analíticas del Laboratorio de Salud Pública para la generación de intervenciones sanitarias.

Palabras clave

Estandarización, validación, ISO 17025, atributos analíticos.

ANTECEDENTES

El Laboratorio de Salud Pública de la Secretaría de Salud de Bogotá, en el marco de sus funciones, realiza procedimientos analíticos para la vigilancia de factores de riesgo y eventos de interés en salud pública a través de los grupos de trabajo de vigilancia del ambiente y el consumo, y vigilancia de enfermedades. Los procedimientos analíticos generan resultados que son la base para la realización de acciones en salud pública.

El Laboratorio de Salud Pública, en busca del proceso de mejoramiento continuo, está desarrollando un sistema de aseguramiento de la cali-

dad, puesto en marcha a través del trabajo conjunto de todos los funcionarios. Dentro de este proceso es pilar fundamental la validación de las técnicas analíticas de acuerdo con los requerimientos de la Norma Técnica Colombiana NTC ISO 17025, de tal suerte que las pruebas utilizadas cumplan con los requisitos establecidos para éstas. Uno de los mecanismos para la monitorización de la eficiencia de estos procedimientos analíticos es la estandarización, etapa posterior a la validación de las técnicas.

OBJETIVOS

Planear, diseñar y ejecutar la estandarización de las metodologías analíticas cuyo montaje ha sido realizado con anterioridad, que son el soporte de los resultados que se emiten en los distintos procedimientos analíticos de eventos de interés en salud pública.

MARCO TEÓRICO

Definición

La estandarización consiste en ajustar un método analítico a determinadas normas y formas, y comprende las siguientes etapas(1,2): montaje, validación, cálculo de atributos y cartas de control.

Montaje

En la etapa de montaje se establece un procedimiento analítico. Es la etapa de la estandarización mediante la cual se definen los atributos del método a ensayar, que incluye los siguientes pasos:

- Procedimiento detallado de análisis, asimilación del método.
- Verificación de equipos, reactivos y elementos de laboratorio.
- Ensayo de respuesta o señal.
- Concentraciones más bajas y más altas que se espera encontrar en la muestra.
- Ensayo preliminar de reproducibilidad.

Validación

La validación es un proceso netamente experimental, efectuado mediante estudios de laboratorio, que permite evaluar o determinar la conveniencia o capacidad de un esquema analítico particular, cuyas características de diseño cumplen con los requerimientos metodológicos y de resultados para la aplicación analítica propuesta, que involucra el desarrollo de un protocolo que incluye la estimación de las medidas de *precisión* y *exactitud* aplicables a cualquier método analítico, esté o no normalizado.

Cálculos de los atributos

Son los que se derivan del proceso de validación, e identifican el método; éstos son:

- **Límite de detección:** mínima concentración detectable del analito que no puede cuantificarse.
- **Límite de cuantificación:** valor de la concentración a partir de la cual tiene significado cuantitativo.
- **Exactitud:** grado de proximidad entre una medida y el valor verdadero o esperado y está definido por la recuperación.
- **Precisión:** grado de proximidad entre resultados que se efectúan repetitivamente y en forma independiente, y está relacionada con el coeficiente de variación.
- **Sensibilidad:** corresponde a la mínima cantidad de analito que puede producir un resultado significativo.
- **Rango útil:** rango de concentración comprendido entre el límite de cuantificación y el límite de linealidad (máximo valor de la concentración a partir de la cual no tiene significado cuantitativo).

Cartas de control

Es el procedimiento interno que se realiza para verificar que el método validado cumple con los requisitos establecidos; permite llevar un registro diario del procedimiento, siempre que se haga una marcha analítica.

MÉTODOS

A continuación se describe la metodología empleada en el proceso de estandarización.

NORMA GUÍA

Se utiliza la norma guía ISO 5725 (2), que fija las pautas para determinar la exactitud de un método de ensayo y sus resultados, tomando como referencia la repetitividad y reproducibilidad, que permiten calcular la precisión y exactitud de un método estándar de medida.

METODOLOGÍA

I. ENSAYO PRELIMINAR DE REPRODUCIBILIDAD

Después de establecer el método de ensayo –cuya asimilación se ha llevado a cabo con detalles– y se conoce la respuesta o señal que lo caracteriza, hay que definir:

- Concentración máxima de interés, que se denomina C.
- Se prepara una solución acuosa del patrón, en una concentración equivalente al 9% C (0,09 C) y otra del 90% de C (0,9 C).
- Se preparan 10 réplicas del blanco, 10 réplicas de la concentración baja (0,09 C) y 10 réplicas de la concentración alta (0,9 C).
- Estas soluciones se corren por el procedimiento analítico a ensayar.
- Se tabulan los datos de las concentraciones y la respectiva señal.
- Se grafican los datos anteriores, es decir, señal obtenida frente a concentración.
- Se calcula la ecuación correspondiente.

Mediante un programa establecido para la calibración de métodos analíticos denominado Kalibo, se calculan tanto la ecuación correspon-

diente como los atributos definidos anteriormente, de donde se determina también el coeficiente de variación del método, el cual se compara con la literatura. Este coeficiente de variación, de acuerdo con la gráfica de Horwitz, establece los valores que según las unidades de concentración del analito que se escoja fijan las pautas para determinar la precisión del método.

2. INTERFERENCIA POR MATRIZ

Una vez realizado el ensayo preliminar de reproducibilidad, es necesario verificar el comportamiento del analito en la muestra, o matriz de interés. Para ello se requiere:

- a) Disponer de dos muestras –M1 y M2–, cuya concentración del analito sea lo más cercana a cero.
- b) Adicionar estas muestras con el analito en las siguientes concentraciones: 0,4 C y 0,7 C, denominadas A1 y A2 respectivamente, así:

$$M1 + A1 = 0,4C$$

$$M2 + A2 = 0,7C$$

Preparar un lote de soluciones, que consta de lo siguiente:

- 2 blancos denominados BK1 y BK2 (soluciones sin analito)
- 1 patrón de concentración 0,9 C
- 1 patrón de concentración 0,09 C
- 1 Muestra M1
- 1 Muestra M2
- 1 Muestra M1 + adición 0,4 C
- 1 Muestra M2 + adición 0,7 C

Estas soluciones se procesan por el método analítico a ensayar.

Los datos obtenidos de la señal y la concentración se grafican y se determina la ecuación, por el mismo procedimiento que el ensayo de reproducibilidad.

Se compara la pendiente obtenida con la del ensayo de reproducibilidad: si son similares se dice que el procedimiento analítico no pre-

senta interferencia por matriz, es decir, que el analito se comporta de la misma forma en la matriz de interés que en la solución acuosa.

3. VALIDACIÓN

Diseño experimental

Una vez realizados los anteriores procedimientos, los cuales corresponden a la etapa de montaje, se entra de lleno a la etapa de validación. De acuerdo con la metodología adoptada por el Instituto Nacional de Salud (1), la mínima cantidad de soluciones a analizar que conforman el diseño experimental son 48, distribuidas en seis (6) lotes de ocho (8) soluciones cada uno. Si el analito es estable, todas las soluciones pueden prepararse el mismo día; una vez codificadas en forma aleatoria debe entregarse un lote para ser procesado diariamente y en forma consecutiva por el analista. Si el analito no es estable, se realiza el mismo procedimiento, pero cada lote debe prepararse diariamente hasta completar el total de soluciones que conforman el set.

Una vez que se procesa la totalidad de las muestras que conforman el set, se descodifican las soluciones por parte del referente de validación en presencia del analista responsable. Los datos de concentraciones y la respectiva señal de cada una de las soluciones analizadas se registran en la tabla de captura de datos, para su tratamiento estadístico.

De acuerdo con la norma guía ISO 5725 (2), dentro de cada lote solamente se repiten los blancos, por tanto se habla de repetitividad dentro del lote (r), y además se reproducen entre los seis lotes o sea que se cumplen condiciones de reproducibilidad (R). Las demás soluciones solamente cumplen condiciones de reproducibilidad.

Los datos obtenidos expresados en unidades de concentración son sometidos a tratamiento estadístico para verificar condiciones de repetitividad y reproducibilidad mediante el análisis de varianzas y desviaciones estándar entre lotes y dentro de los lotes, cuya desviación estándar total elevada al cuadrado, o sea la varianza, se compara con los límites de confianza establecidos.

Cuando los datos analizados se encuentran dentro de los rangos permisibles, se dice que se han alcanzado las metas en cuanto a precisión.

De otra parte, se hace la diferencia entre las concentraciones de las muestras adicionadas ($M1 + A1$) y ($M2 + A2$), de las respectivas muestras sin adicionar $M1$ y $M2$; el resultado se conoce como la recuperación real, que se compara con la recuperación teórica esperada. Si el valor obtenido está dentro del rango del 95 al 105%, se dice que el método de ensayo tiene una recuperación satisfactoria (exactitud).

Cuando el método de ensayo ha alcanzado las metas en cuanto a precisión y a exactitud, se dice que el método ha sido validado.

4. ATRIBUTOS FINALES

Con los datos de las señales y las correspondientes concentraciones se construye la función lineal final, que por el programa Kalibo nos permite calcular de nuevo los atributos finales del método, definidos en el ensayo de reproducibilidad. Cuando el método validado presenta los atributos finales, se dice que ha sido estandarizado.

5. CONTROL INTERNO

Para monitorear el método estandarizado se elaboran las cartas de control, donde una muestra o un patrón son sometidos a 20 ensayos repetitivos cuyos datos se tabulan, y se calculan el valor medio y la desviación estándar. Se establecen unos límites de confianza del valor medio más dos desviaciones estándar, y el valor medio menos dos desviaciones estándar denominados límites superior e inferior. Una vez se realiza una marcha analítica, se corre de la misma forma la muestra o patrón con la que se elaboraron los límites, y se registra el dato obtenido. Los datos obtenidos deben presentar una distribución normal alrededor de la media. Cuando cinco datos consecutivos presentan tendencia ascendente o descendente alrededor de la media, significa que los datos que se obtengan al utilizar este control en la sexta lectura no podrán reportarse, obligando a revisar la metodología de análisis.

ATRIBUTOS DE LAS METODOLOGÍAS ESTANDARIZADAS

MÉTODOS CUANTITATIVOS

Metodología	Límite de detección	Límite de cuantificación	Exactitud	Precisión	Sensibilidad	Rango útil	Responsable
Determinación de yodo en sal para consumo humano, método del ION ESPECÍFICO	0.0189 ppm	0.084 ppm	99,75 %	3,95%	60 mv/ ppm	0.084–100 ppm	Ana Elvira Bonilla
Determinación de flúor en sal para consumo humano método del ION ESPECÍFICO	0.01163 ppm	0.0165 ppm	99.36 %	1,79 %	53.25 mv/ ppm	0.0165–100 ppm	Ana Elvira Bonilla
Determinación del yodo total en sal para consumo humano, método del agua de bromo	0.36 ppm	1.2ppm	97,0 %	0,2665 %	0.945 ml /mg/L	1.2 – 100 ppm	Ana Elvira Bonilla
Determinación del contenido de vitamina B1 o Tiamina en harina de trigo fortificada por HPLC	0.004638 ug / ml	0.015461 ug / ml	85.6 %	7.6113 %	7902753.00 área/ ug / ml	0.01546-1 ug /ml	Ignacia Espinosa
Determinación del contenido de vitamina B2 o Riboflavina en harina de trigo fortificada por HPLC	0.0506 mg / kg	0.0506 mg / kg	5.5 %	1.2223 %	11086500 área/ ug / ml	0.050 mg kg- 8 mg / kg	Ignacia Espinosa

RESULTADOS

Metodología	Límite de detección	Límite de cuantificación	Exactitud	Precisión	Sensibilidad	Rango útil	Responsable
Hierro en harinas fortificadas por el método de la ortofenantrolina (3)	0.069 mg /L	0.2231 mg / l	102,44 %	1,6812 %	0.1670 abs / mg / l	0.223145 – 3.5 mg / l	Ignacia Espinosa
Trimetilamina en pescados, método espectrofotométrico	0.00006 mg /	0.00026 mg / ml	94,9 %	2,01 % mg / m	344.806 abs/ l	0.0 – 0.0288 mg tma / ml	Alexis Sánchez
Almidón en productos cárnicos procesados, método colorimétrico (3)	0.1960 ppm de glucosa	0.83 ppm de glucosa	103,3 %	0,4128 %	0.015503 abs / ppm	0.0 – 50 ppm	Alexis Sánchez
Determinación del contenido de nitritos en cárnicos procesados, método espectrofotométrico (3)	0.010482 ppm	0.037224 ppm	89,3 %	1,3434 %	0.5734 abs / ppm	0.0–0.8 ppm	Alexis Sánchez
Cloruros en aguas, método volumétrico (4)	0.011473 mg / l	0.011476 mg / l	104,15 %	0,069078%	0.011473 ml / mg/ l	0.011473 – 270 mg / l	Fedra Rodríguez
Cloruros en leches, método cuantitativo de Drost (3)	0.055078 g /l	0.183595 g / l	97,6 %	2,034 %	1.70092 ml / g / l	0.18359 – 2.7 g / l	Juan V. Gómez
Metamizol como principio activo en tabletas, método espectrofotométrico	0.132284 ug/ ml	0.7450 ug / ml	97-103 %	3 %	0.026447 abs/ ml	2.7 – 30 ug / ml	Fabio Salazar H.
Azúcares totales y azúcares reductores en panelas, método de Fehling (3)	3 %g/ 100g	4.22 g / 100 g	95,7 %	0,4128 %	35 – 100 %	(g / 100 g)	Margarita Rodríguez

Fuente: metodologías validadas en el Laboratorio de Salud Pública de Bogotá.

CONCLUSIONES

1. Todas las metodologías sometidas al proceso de estandarización, cuyo montaje había sido realizado con anterioridad, donde la experiencia de los profesionales en cada procedimiento analítico era comprobada, fueron factores preponderantes para llevar sin tropiezos el proceso de estandarización.
2. Los equipos del Laboratorio de Salud Pública empleados en las distintas marchas analíticas presentaron respuesta satisfactoria en todas las etapas del proceso, gracias al servicio de mantenimiento preventivo y correctivo establecido.
3. La evidencia científica permite determinar la alta confiabilidad de los procesos analíticos del LSP, y por ende la seguridad para la generación de intervenciones sanitarias.
4. La metodología aplicada para validación evidenció resultados prácticos acordes con los diseños teóricos.
5. A pesar de la aparente dificultad metodológica del proceso de validación, la experiencia práctica del Laboratorio de Salud Pública demuestra la posibilidad de aplicar esta metodología en todos los laboratorios de nuestro país.
6. La experiencia de validación de técnicas analíticas en el Laboratorio de Salud Pública prueba que el proceso de validación se puede realizar paralelamente con el trabajo rutinario analítico del laboratorio, sin el requerimiento de dedicación exclusiva.

RECOMENDACIONES

1. Expandir el proceso de validación de técnicas analíticas a los laboratorios de salud pública del país y a los laboratorios de análisis en general.
2. Iniciar los procesos de validación de grandes laboratorios por las técnicas de mayor relevancia para la salud pública en general o para el proceso analítico en particular.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la doctora Luz Adrian Zuluaga por su apoyo técnico en la revisión y sus aportes en el desarrollo metodológico de este manuscrito.

Al doctor Jorge Ortiz Barón del Instituto Nacional de Salud, cuyo desarrollo de estas metodologías en el INS permitió la implementación de las mismas en el Laboratorio de Salud Pública de Bogotá.

REFERENCIAS

1. Ortiz J. Curso de capacitación en validación de metodologías analíticas, Instituto Nacional de Salud.
2. Norma Técnica Colombiana NTC/ ISO 5725.
3. AOAC, Association of Official Analytical Chemists, 15 ed., 1990.
4. Codex Alimentarius; 1999.

