

Continguts: www.acclc.cat/ivv_docs.php?any=2015*In vitro veritas*Pàgina web de la revista: www.acclc.cat/ivv.php**Article original****Validació de sistemes de mesura basats en la cromatografia líquida d'alta eficàcia**

Raül Rigo Bonnin

Secció de Fàrmacs, Àrea de Bioquímica Especial, Laboratori Clínic de l'Hospital Universitari de Bellvitge, Laboratori Clínic Territorial Metropolitana Sud, L'Hospitalet de Llobregat

2015 © Publicat per l'Associació catalana de ciències de Laboratori Clínic

ÍNDEX

1. Introducció
2. Objecte i camp d'aplicació
3. Vocabulari
4. Validació de sistemes cromatogràfics
 - 4.1 Preparació de solucions i materials diversos
 - 4.1.1. Reactius i dissolvents
 - 4.1.2. Preparació de materials de calibratge i materials de control
 - 4.1.3. Preparació de solucions d'estàndard intern
 - 4.2 Calibratge i sensibilitat
 - 4.3 Precisió de mesura. Repetibilitat i precisió en un laboratori
 - 4.3.1. Mostres per a l'estudi
 - 4.3.2. Disseny experimental
 - 4.4 Veracitat de mesura. Biaix de mesura en un laboratori
 - 4.4.1. Mostres per a l'estudi
 - 4.4.2. Disseny experimental
 - 4.5 Exactitud de mesura. Error de mesura
 - 4.5.1. Estimació de l'error de mesura mitjançant la participació en programes d'avaluació externa de la qualitat
 - 4.5.2. Estimació de l'error de mesura quan no hi ha disponibles programes d'avaluació externa de la qualitat
 - 4.6. Capacitat de detecció. Valor crític, límit de detecció i límit de quantificació
 - 4.6.1. Mostres per a l'estudi
 - 4.6.2. Disseny experimental
 - 4.6.3. Càlcul del valor crític, límit de detecció i límit de quantificació
 - 4.7. Interval de mesura. Linealitat
 - 4.7.1. Mostres per a l'estudi
 - 4.7.2. Disseny experimental
 - 4.8. Selectivitat
 - 4.8.1. Mostres per a l'estudi
 - 4.8.2. Disseny experimental
 - 4.9. Arrossegament o residualitat
 - 4.9.1. Mostres per a l'estudi
 - 4.9.2. Disseny experimental
 - 4.10 Eficiència del procés cromatogràfic: recuperació i efecte matriu
 - 4.10.1. Mostres per a l'estudi
 - 4.10.2. Preparació de solucions de treball
 - 4.10.2.1 Preparació de solucions de treball de l'analit a partir de mostres de pacients
 - 4.10.2.2 Preparació de solucions de treball de l'analit a partir de l'extracte de les mostres de blanc de pacients
 - 4.10.2.3 Preparació de solucions de treball de l'analit a partir d'un dissolvent (fase mòbil)
 - 4.10.2.4 Preparació de solucions de treball d'estàndard intern a partir de mostres de blanc de pacients
 - 4.10.2.5 Preparació de solucions de treball d'estàndard intern a partir de l'extracte de mostres de blanc de pacients
 - 4.10.2.6 Preparació de solucions de treball de l'estàndard intern a partir d'un dissolvent (fase mòbil)
 - 4.10.3. Disseny experimental
 - 4.10.4. Càlcul de la recuperació, l'efecte matriu i l'eficiència del procés cromatogràfic
 - 4.11 Estabilitat
 - 4.11.1. Mostres per a l'estudi
 - 4.11.2. Disseny experimental
 - 4.11.2.1 Estudi de l'estabilitat en les diferents solucions primàries, secundàries i de treball
 - 4.11.2.2 Estudi de l'estabilitat a curt i llarg termini
 - 4.11.2.3 Estudi del nombre de cicles de congelació-descongelació
 - 4.11.2.4 Estudi de l'estabilitat a curt termini en mostres de pacients
 - 4.11.2.5 Estudi de l'estabilitat en el mostrejador automàtic
5. Bibliografia

1. Introducció

Des de fa diversos anys, els centres d'investigació, la indústria farmacèutica i diverses empreses de la indústria del diagnòstic *in vitro* empenen sistemes de mesura basats en la cromatografia líquida d'alta eficàcia¹ o HPLC (acrònim de l'anglès *high-performance liquid chromatography*) per investigar i desenvolupar nous fàrmacs o biomarcadors, degut a l'elevada capacitat per separar, aïllar, identificar i quantificar diversos components d'una mostra (també anomenats *analits*) i a les propietats metrològiques que presenten. Per contra, en l'àmbit de les ciències de laboratori clínic la incorporació i la utilització d'aquests sistemes ha sigut tardana degut, principalment, a que tenen com a principals inconvenients, una certa complexitat de maneig i d'interpretació de dades.

Malauradament, per al mesurament o l'examen de diverses propietats biològiques, són poques les empreses del diagnòstic *in vitro* que han desenvolupat procediments de mesura cromatogràfics i validat sistemes de mesura basats en l'HPLC (d'ara en endavant, sistemes cromatogràfics). Aquesta situació obliga als professionals de les ciències de laboratori clínic a haver de desenvolupar els seus propis procediments i a validar els sistemes que utilitzen. Així mateix, si els laboratoris clínics estan acreditats segons la norma ISO 15189:2012 (1), aquest fet pren una major importància donat que la norma exigeix que els laboratoris facin servir sistemes de mesura que hagin sigut validats prèviament. La norma també especifica que aquesta validació ha de ser tan exhaustiva com sigui necessari i que s'ha de comprovar, mitjançant la provisió d'evidència objectiva, que s'han complert els requisits específics per a la seva utilització prevista. Per altra banda, tot i que la norma anomena quines són les propietats metrològiques que haurien d'estudiar els laboratoris per dur a terme la validació dels seus sistemes de mesura —la veracitat de mesura, l'exactitud de mesura, la precisió de mesura, la incertesa de mesura, l'especificitat o selectivitat metrològica, la sensibilitat metrològica, els límits de detecció i quantificació i l'interval de mesura— no dona detalls exhaustius de com realitzar l'estudi d'aquestes propietats metrològiques.

2. Objecte i camp d'aplicació

L'objecte d'aquest document és presentar una proposta de guia per als laboratoris clínics que els permeti validar sistemes cromatogràfics.

El camp d'aplicació d'aquest document abasta la validació de sistemes de mesura que permetin el mesurament de magnituds biològiques corresponents a escales racionals i que utilitzin, com a principis de mesura, l'HPLC acoblada a l'espectrometria d'absorció molecular (a l'ultraviolat, al visible o a l'infraroig), l'HPLC acoblada a la fluorimetria, l'HPLC acoblada a la voltamperometria, l'HPLC acoblada a la conductimetria, l'HPLC acoblada a la refractometria, l'HPLC acoblada a l'espectrometria de masses o MS (acrònim de l'anglès *mass spectrometry*) (HPLC-MS) o l'HPLC acoblada a l'espectrometria de masses en tàndem (HPLC-MS/MS).

¹ Els sistemes de mesura basats en la cromatografia líquida d'alta eficàcia als quals es fa referència consten d'un cromatògraf líquid d'alta eficàcia i un espectròmetre de masses o d'un cromatògraf líquid d'alta eficàcia i un detector d'absorbància (detector ultraviolat, visible o d'infrarojos), detector de matriu de díodes, detector fluorimètric, detector voltamperomètric (electroquímic), detector conductimètric, detector d'índex de refracció i detector evaporatiu de dispersió de llum

Aquest document no contempla la validació de les propietats semiològiques de les magnituds biològiques. S'entén que els laboratoris clínics incorporen sistemes cromatogràfics que permeten mesurar magnituds biològiques relacionades amb nous fàrmacs o biomarcadors, només quan ja hi ha evidència científica de la seva utilitat clínica. També s'exclou en aquest document, la verificació o la validació de la capacitat d'operaris (habilitació) dels sistemes cromatogràfics.

Aquest document va dirigit a tots els tipus de laboratori clínic.

3. Vocabulari

En aquest document són aplicables, entre altres, els termes de la Federació Internacional de Química Pura i Aplicada (IUPAC), l'Institut per a la Normalització de Laboratoris Clínics (CLSI), l'Agència Europea del Medicament (EMA) i la tercera edició del Vocabulari Internacional de Metrologia (2-9):

analit: component biològic d'una mostra relacionat amb la magnitud biològica que es vol mesurar

arrossegament (“carry-over”): procés en el qual uns materials són transportats a una barreja de reacció a la que no pertanyen

NOTA: Aquests materials poden ser o bé parts d'un espècimen o mostra, o reactius incloent diluents o solucions de rentat.

avaluació externa de la qualitat: sistema de comparació de valors mesurats de diferents laboratoris, realitzat de manera objectiva i retrospectiva per una organització externa

NOTA 1: Aquesta comparació és necessàriament retrospectiva i no presenta cap influència en els valors mesurats dels pacients obtinguts en un determinat dia.

NOTA 2: Els valors mesurats obtinguts per cada laboratori són comparats amb els valors mesurats obtinguts per la resta de laboratoris participants. Habitualment, empenen valors mesurats de control obtinguts de forma esporàdica però periòdica. Aquests valors no són coneguts pels laboratoris participants i per tant, les diferents magnituds biològiques es mesuren “a cegues”.

biaix de mesura: estimació d'un error sistemàtic

calibratge: operació que, en condicions determinades, estableix en una primera etapa una relació entre els valors, amb les seves incerteses de mesura, d'uns patrons i les indicacions corresponents, amb les seves incerteses, i que després utilitza en una segona etapa aquesta informació per establir una relació que permet obtenir un resultat de mesura a partir d'una indicació

capacitat de detecció: capacitat d'un sistema de mesura per obtenir valors d'una magnitud propers a zero

condicions de precisió intermèdia: condició de mesura en un conjunt de condicions que inclou el mateix procediment de mesura, el mateix lloc i mesures repetides del mateix objecte o objectes similars durant un període de temps ampli, però que pot incloure altres condicions que poden variar

condicions de repetibilitat: condició de mesura en un conjunt de condicions que inclou el mateix procediment de mesura, els mateixos operadors, el mateix sistema de mesura, les mateixes condicions de funcionament i el mateix lloc, així com també mesures repetides del mateix objecte o objectes similars durant un curt període de temps

corba de calibratge: expressió de la relació entre una indicació i un valor d'una magnitud

cromatògraf: sistema de mesura que permet dur a terme la separació cromatogràfica

cromatografia: principi de mesura físic de separació en el qual els components a separar d'una mostra es distribueixen entre

dues fases, una que és estacionària (fase estacionària) mentre que l'altra, (la fase mòbil) es mou en una direcció determinada

cromatografia líquida d'alta eficàcia: cromatografia on la fase mòbil és un líquid. La cromatografia es porta a terme en una columna farcida de partícules molt petites i amb una pressió elevada

efecte d'arrossegament: biaix ocasionat per la transferència o arrossegament entre dos espècimens

efecte matriu: biaix que afecta al mesurament d'una magnitud biològica com a conseqüència de l'efecte combinat de tots els components d'una mostra

NOTA: Si el component de la mostra que produeix aquest efecte és identificat, rep el nom d'*interferent* i el procés o efecte que ocasiona es coneix com a *interferència*.

error de mesura: diferència entre el valor mesurat d'una magnitud i el valor de referència [metrològic] d'una magnitud

error sistemàtic: component de l'error de mesura que, en mesures repetides, roman constant o varia de manera previsible

espectròmetre de masses: instrument que permet mesurar les abundàncies i relacions massa/càrrega dels ions en fase gasosa

espectrometria de masses: estudi de la matèria a través de la formació d'ions en fase gasosa que són caracteritzats, mitjançant un espectròmetre de masses, segons la seva massa, càrrega, estructura o propietats fisicoquímiques

estabilitat: període de temps en el qual una magnitud biològica manté els seus valors dins d'uns límits establerts i en unes condicions especificades

exactitud de mesura: concordança entre un valor mesurat i un valor vertader d'un mesurand

NOTA: L'exactitud de mesura no té valor numèric però aquesta es pot estimar mitjançant l'error de mesura o la incertesa de mesura.

heterocedasticitat: propietat d'un sistema de mesura on la variància metrològica és la mateixa per a qualsevol valor del mesurand, dins d'un interval de valors individual

homocedasticitat: propietat d'un sistema de mesura on la variància metrològica depèn del valor del mesurand, dins d'un interval de valors individual

imprecisió: desviació estàndard, variància o coeficient de variació observat a partir dels resultats obtinguts efectuant mesures repetides en un material adequat sota unes condicions de mesura especificades

indicació: valor subministrat per un instrument de mesura o un sistema de mesura

incertesa de mesura: paràmetre no negatiu que caracteritza la dispersió dels valors atribuïts a un mesurand a partir de les informacions utilitzades

interferència: biaix que afecta el mesurament d'una magnitud biològica com a conseqüència de l'efecte d'un component específic en una mostra

interferent: component específic d'una mostra que produeix una interferència

interval de mesura: conjunt de valors de magnituds d'un mateix tipus que un instrument de mesura o un sistema de mesura determinat pot mesurar amb una incertesa instrumental donada, en condicions determinades

límit de detecció: valor mesurat mínim obtingut amb un sistema de mesura determinat, per al que la probabilitat de què aquest valor no excedeixi el valor crític és β . Habitualment $\beta = 0,05$

límit de quantificació: valor mesurat mínim que es pot estimar amb una imprecisió acceptable

linealitat: característica d'un sistema de mesura donada pel fet que la seva funció de calibratge coincideix amb l'equació d'una recta

magnitud: propietat d'un fenomen, d'un cos o d'una substància, que es pot expressar quantitativament mitjançant un número i una referència

material de referència: material suficientment homogeni i estable en relació a unes propietats determinades, que s'ha establert com apte per al seu ús previst en una mesura o examen de propietats biològiques

material de referència certificat: material de referència acompanyat d'una documentació lliurada per un organisme autoritzat i que subministra un o més valors de propietats individuals, amb les incerteses i les traçabilitats associades, utilitzant procediments validats

matriu: tots els components d'una mostra que són diferents al component que forma part de la magnitud que es mesura

mesurand: magnitud que es vol mesurar

precisió de mesura: concordança entre les indicacions o els valors mesurats obtinguts mitjançant mesures repetides del mateix objecte o objectes similars en condicions especificades

NOTA 1: La precisió s'expressa numèricament mitjançant estudis d'imprecisió basats en el càlcul de la desviació estàndard, la variància o el coeficient de variació.

NOTA 2: Les condicions especificades poden ser, per exemple, condicions de repetibilitat, condicions de precisió intermèdia o condicions de reproductibilitat.

NOTA 3: La precisió s'utilitza per definir la repetibilitat de mesura, la precisió intermèdia de mesura o la reproductibilitat de mesura.

precisió en un laboratori: precisió de mesura que conté la repetibilitat i la precisió en condicions intermèdies

precisió intermèdia de mesura: precisió de mesura sota un conjunt de condicions de precisió intermèdia

procediment de mesura: descripció detallada d'una mesura d'acord amb un o més principis de mesura i a un mètode de mesura determinat, fonamentat en un model de mesura i incloent tot el càlcul destinat a obtenir un resultat de mesura

recuperació: fracció de la quantitat total d'una substància que es recupera després d'un procés químic

repetibilitat de mesura: precisió de mesura d'acord amb un conjunt de condicions de repetibilitat

selectivitat d'un sistema de mesura: característica d'un sistema de mesura, emprant un procediment de mesura determinat, gràcies a la qual el sistema subministra valors mesurats, per a un o més mesurands, de manera que els valors de cada mesurand són independents d'altres mesurands o altres magnituds del fenomen, cos o substància que s'investiga

sensibilitat d'un sistema de mesura: quocient entre la variació d'una indicació d'un sistema de mesura i la variació corresponent del valor de la magnitud mesurada

sistema de mesura: conjunt d'un o diversos instruments de mesura i sovint d'altres dispositius, incloent-hi, si cal, reactius o altres subministraments, ajuntats i adaptats per proporcionar informacions destinades a l'obtenció de valors de magnituds mesurats dintre d'uns intervals especificats, per a magnituds especificades

soroll d'un sistema de mesura: fluctuacions aleatòries que es produeixen en una indicació que són inherents al sistema de mesura

temps de retenció: temps transcorregut des que el component d'una mostra és injectat fins que arriba al detector

traçabilitat metrològica: propietat d'un resultat de mesura gràcies a la qual aquest resultat pot ser relacionat a una referència mitjançant una cadena ininterrompuda i documentada de calibratges, que contribueixen a la incertesa de mesura

validació: verificació en la que els requisits especificats són adequats per a un ús determinat

valor d'una magnitud: conjunt d'un número i una referència que constitueix l'expressió quantitativa d'una magnitud

valor crític [metrològic]: valor mínim obtingut amb un sistema de mesura determinat, per al que la probabilitat de que aquest valor sigui zero és α . Habitualment $\alpha = 0,05$

veracitat de mesura: concordança entre la mitjana d'un nombre infinit de valors mesurats repetits i un valor de referència [metrològic] d'una magnitud

NOTA: La veracitat no té valor numèric però aquesta està inversament relacionada amb l'error sistemàtic el qual pot ser estimat com un biaix de mesura.

verificació: provisió de proves objectives que una entitat donada satisfà uns requisits determinats

4. Validació de sistemes cromatogràfics

La utilització d'un sistema cromatogràfic determinat, igual que qualsevol sistema de mesura que s'empra en un laboratori clínic, ha de comportar un procés previ de validació que permeti comprovar, mitjançant la provisió d'evidència objectiva, que s'han complert els requisits específics per a la seva utilització prevista. És, per tant, imprescindible que els laboratoris clínics estableixin aquests requisits abans de dur a terme el procés de validació (1). Aquests requisits poden ser de caràcter obligatori, basats en disposicions legals (10-14), obtinguts a partir de recomanacions publicades per organitzacions científiques nacionals o internacionals (15-18), o bé, en el cas que no n'hi hagi per poder-s'hi acollir, el propi laboratori clínic els haurà d'establir. Per altra banda, els laboratoris clínics també hauran de detallar, documentar i enregistrar tota la informació relacionada amb el procés de validació (procediment de mesura cromatogràfic desenvolupat, sistema cromatogràfic utilitzat, reactius o materials emprats, requisits metrològics establerts o adoptats, resultats obtinguts de les propietats metrològiques estudiades, entre altres).

Cal esmentar que el procés de validació d'un sistema cromatogràfic no difereix de qualsevol altre sistema de mesura que s'utilitza en un laboratori clínic. Tot i això, degut a les característiques pròpies que presenta un sistema cromatogràfic, algunes de les propietats metrològiques considerades en el procés de validació hauran d'estudiar-se d'una manera més exhaustiva i particular.

Existeixen diferents guies o recomanacions genèriques (9, 19-27) o específiques (28-87) publicades per organismes internacionals o nacionals, societats científiques o grups d'experts que fan referència a la validació de sistemes de mesura. Totes aquestes guies especifiquen que en la validació d'un sistema de mesura s'han de tenir present o estudiar els següents aspectes o propietats metrològiques: la preparació de solucions i materials diversos, el calibratge i la corba de calibratge, la sensibilitat metrològica, l'interval de mesura i la linealitat, la capacitat de detecció (valor crític, límit de detecció i límit de quantificació), la precisió de mesura (en condicions de repetibilitat i en condicions intermèdies), la veracitat de mesura, l'error de mesura, la selectivitat, l'arrossegament, l'eficiència d'un procés (la recuperació i l'efecte matriu —principalment en sistemes basats en l'HPLC-MS o l'HPLC-MS/MS—) i l'estabilitat.

Per dur a terme el procés de validació de sistemes cromatogràfics del present document, de totes les guies genèriques o específiques existents a la bibliografia, s'han fet

servir, principalment, aquelles que són específiques de sistemes cromatogràfics, les més recents i les més àmpliament utilitzades.

4.1. Preparació de solucions i materials diversos

4.1.1. Reactius i dissolvents

Un dels requeriments essencials quan es treballa amb sistemes cromatogràfics és que els reactius genèrics i dissolvents que s'empren per preparar la fase mòbil, els materials de calibratge o de control, els estàndards interns i altres solucions presentin una elevada puresa o riquesa (qualitat HPLC o HPLC-MS)². De no ser així, es pot comprometre el mesurament de la magnitud en estudi (separació, resolució i eficàcies cromatogràfiques inapropiades que poden donar lloc a una menor reproductibilitat i capacitat de detecció, entre altres), així com condicionar el bon funcionament del sistema cromatogràfic (obstrucció de cànules, tubs, vàlvules, injectors, detectors, entre altres).

4.1.2. Preparació de materials de calibratge i materials de control

Per a la validació de sistemes cromatogràfics, sempre que sigui possible, és recomanable que s'utilitzin materials de calibratge i de control comercials i que la seva preparació es realitzi seguint les instruccions i recomanacions descrites pel seu fabricant. D'aquesta manera, es pot arribar a simplificar el procediment de mesura cromatogràfic i aconseguir disminuir les possibles fonts d'error resultants de la seva preparació "casolana". D'altra banda, és imprescindible que aquests materials presentin valors assignats traçables a una unitat SI, a un material de referència o a un procediment de referència de la major qualitat metrològica possible.

Malauradament, per a la majoria de les magnituds biològiques que es mesuren mitjançant sistemes cromatogràfics, són poques les empreses del diagnòstic *in vitro*³ a on es poden adquirir els materials que compleixin els requisits abans esmentats, obligant als laboratoris clínics a haver de preparar els seus propis materials de calibratge i materials de control.

En aquests casos, per a la preparació dels diferents materials, s'han de fer servir, per una banda, materials de referència certificats de l'analític⁴, dels quals es conegui la seva puresa o riquesa, la seva traçabilitat (a poder ser al Sistema Internacional d'Unitats) i incertesa de mesura i, per una altra banda, una barreja

² En l'actualitat existeixen diverses empreses que distribueixen els reactius o dissolvents que compleixen amb aquestes característiques de puresa o riquesa, com per exemple, Sigma Aldrich (<http://www.sigmaaldrich.com/spain.html>), Merck-Millipore (<http://www.merck.es/es/index.html>) o <http://www.merckmillipore.com/ES/es>, Fisher Scientific (<https://es.fishersci.com/es/>), Panreac (<http://www.panreac.es/es/>), VWR (<https://es.vwr.com/app/Home>), entre altres.

³ Les principals empreses on es poder obtenir aquests materials de calibratge i de control són Chromsystems (<http://chromsystems.com/en-gb>) i Recipe (<http://www.recipe.de/en/index.html>).

⁴ Existeixen diverses empreses o organitzacions que distribueixen materials de referència certificats, entre les que es poden destacar l'Institut Nacional de Patrons i Tecnologia (NIST; de l'anglès National Institute of Standards and Technology; <http://www.nist.gov/srm/index.cfm>), l'Organització Mundial de la Salut (OMS; <http://www.who.int/bloodproducts/catalogue/en/>), la Farmacopea Europea (EP; de l'anglès European Pharmacopeia; <http://www.edqm.eu/en/ph-eur-reference-standards-627.html>), la Farmacopea dels Estats Units (USP; de l'anglès United States Pharmacopeia; http://www.lgcstandards.com/epages/LGC.sf/es_ES/?ObjectPath=/Shops/LG/C/Categories/%22CATALOGUE%20PHARMA%20CAT%22/H-33/PRODUCTS), Cerilliant, Fluka i Supelco (distribuïdor Sigma-Aldrich; <http://www.sigmaaldrich.com/spain.html>), entre altres.

del líquid biològic en estudi (plasma, sèrum, orina,...) però que no contingui l'analit en qüestió (material de blanc)⁵ (9, 19, 20).

En els casos en què els materials de referència certificats estiguin preparats sobre la matriu biològica en estudi (per ex.: alguns materials de referència del NIST i l'OMS), els materials de calibratge o de control s'han de preparar seguint les instruccions proporcionades pel fabricant.

El nombre mínim recomanable de materials de calibratge a preparar és de set (inclosos els blancs o calibradors 0) i la seva selecció ha de permetre cobrir l'interval de mesura en estudi (9, 19, 24, 25, 27). Per altra banda, el nombre mínim recomanable de materials de control a preparar és de tres. Dos dels materials han de tenir valors de la magnitud biològica en estudi per sota (control baix) i per sobre (control alt) de l'interval de referència, interval terapèutic o valor de decisió clínica (valor discriminant) i l'altre material, ha de presentar un valor que estigui inclòs dins d'aquests intervals o proper al valor discriminant (control mitjà). A més, el material de control baix ha de tenir un valor aproximadament tres vegades el del límit de quantificació (9, 19, 20).

El procediment de preparació dels materials de calibratge i de control seria recomanable que es realitzés de la següent manera (es pot veure un exemple a l'[Annex 1](#)):

- 1) Preparar el material de blanc a partir d'una barreja de mostres de pacients (es recomana utilitzar un mínim de 10 mostres). Una vegada realitzada la barreja, cal verificar que no hi ha analit. Aquesta verificació es pot dur a terme utilitzant la informació clínica de cada un dels pacients així com, processant la mostra en el sistema cromatogràfic.
- 2) Preparar una solució primària de l'analit (*stock solution* en anglès), una per als materials de calibratge i una altra per als materials de control, en un dissolvent apropiat (aigua, metanol o acetonitril, depenent de la solubilitat de l'analit). Cal que les dues solucions es preparin a partir de pesades diferents.
- 3) Preparar diferents solucions secundàries (set per als materials de calibratge i tres per als materials de control), en aigua qualitat HPLC o HPLC-MS, que presentin 10 vegades la concentració teòrica de les solucions de treball (*working solutions* en anglès) dels materials de calibratge i de control a utilitzar.
- 4) Preparar les solucions de treball per als materials de calibratge i de control, afegint 1 part de volum de la corresponent solució secundària realitzada anteriorment sobre 9 parts de volum de material de blanc (dilució 1/10).

Sempre que sigui possible, cada vegada que es realitzin mesuraments interserials de la magnitud en estudi, s'han de preparar de nou les solucions de treball dels materials de calibratge i de control noves, llevat que es pugui garantir que aquestes són estables en unes condicions d'emmagatzematge determinades.

⁵ Només en el cas que l'analit no es trobi en el líquid biològic, per exemple, en el cas dels fàrmacs. Si l'analit es troba en el líquid biològic, és a dir, és un component biològic, com a material de blanc es podria fer servir una solució de clorur sòdic 154 mmol/L i albúmina plasmàtica 50 g/L, una solució salina comercial o aigua qualitat HPLC o HPLC-MS, sempre i quan es conegues que l'efecte matriu és mínim o negligible. Si existeix un efecte matriu significatiu, és recomanable fer servir una barreja del líquid biològic (plasma, sèrum, orina,...) i aplicar un procediment que permeti compensar l'efecte matriu existent, per exemple, mitjançant el procediment de l'addició estàndard (30).

La preparació dels diferents materials s'ha de realitzar fent servir instruments de mesura (pipetes, vasos de precipitats, matrassos aforats, balances analítiques) que continguin els seus corresponents certificats de calibratge.

Per altra banda, s'hauria d'indicar la incertesa de mesura associada a la preparació dels materials de calibratge i de control (80, 81) (es pot veure un exemple a l'[Annex 1](#)).

4.1.3. Preparació de solucions d'estàndard intern

La utilització d'estàndards interns és una pràctica comuna en cromatografia quan s'utilitzen els sistemes cromatogràfics amb una finalitat quantitativa (88, 89).

Un estàndard intern és una substància que s'afegeix a totes les mostres, materials de calibratge i materials de control en una quantitat coneguda constant, permetent compensar o reduir alguns errors que es puguin produir en el procediment de mesura (per exemple, errors atribuïbles a la preparació de la mostra) o bé puguin afectar al sistema de mesura (errors en el pipeteig de mostres, compensació de fluctuacions de senyal en el detector, compensació d'un possible efecte matriu, entre altres) durant el mesurament de la magnitud biològica en estudi.

Idealment, un estàndard intern hauria de presentar les següents propietats (9, 20, 30):

- No trobar-se en la mostra a estudiar.
- Tenir una composició i estructura química similar a la de l'analit. En l'HPLC-MS o l'HPLC-MS/MS, sempre que sigui possible, s'ha de fer servir el propi analit marcat amb isòtops estables (²H, ¹³C, ¹⁵N, entre altres).
- Ser suficientment estable en solució com per garantir que aquest no es degradarà durant els processos de preparació de la mostra i de separació cromatogràfica.
- Proporcionar un senyal analític suficient en el detector cromatogràfic.
- Tenir una resolució cromatogràfica diferenciada de l'analit. És a dir, que l'estàndard intern i l'analit elueixin a diferents temps de retenció i que els seus corresponents pics cromatogràfics estiguin clarament diferenciats entre sí. Per a l'HPLC-MS o l'HPLC-MS/MS, degut a l'elevada selectivitat i especificitat que proporciona un espectròmetre de masses com a detector cromatogràfic, no cal que es compleixi aquesta propietat.
- Eluir després de l'analit per tal de poder confirmar que la separació cromatogràfica ha evolucionat correctament. En l'HPLC-MS o l'HPLC-MS/MS és suficient que l'analit elueixi al mateix temps que l'estàndard intern.

Per a la preparació de solucions d'un o varis estàndards interns, no és necessari que aquesta es realitzi a partir de materials de referència certificats però sí és imprescindible que el material⁶ per dur-les a terme presenti una elevada puresa o

⁶ Existeixen diferents empreses on es poder obtenir materials per a la preparació de solucions d'estàndards interns. Entre elles podem destacar: Chromsystems (<http://chromsystems.com/en-gb/>), Recipe (<http://www.recipe.de/en/index.html>), Cerilliant, Fluka i Supelco (distribuidor Sigma-Aldrich: <http://www.sigmaaldrich.com/spain.html>), Merck-Millipore (<http://www.merck.es/es/index.html>) o <http://www.merckmillipore.com/ES/es/>, AlsaChim (<http://www.alsachim.com/index.php?test=1>), Toronto Research Chemicals (<http://www.trc-canada.com/>) i Medical Isotopes (<http://www.medicalisotopes.com/>), entre altres.

riquesa (9, 20). A més, s'ha de conèixer quines són aquestes impureses i verificar que no continguin l'analít en estudi.

El procediment de preparació de les solucions d'un o varis estàndards interns és recomanable que es realitzi de la següent manera:

- 1) Preparar una solució primària d'estàndard intern en un dissolvent apropiat (aigua, metanol o acetonitril, depenent de la seva solubilitat).
- 2) Preparar una solució de treball d'estàndard intern, en un dissolvent apropiat, que presenti un valor semblant al valor de la magnitud en estudi que es troba dins de l'interval de referència o interval terapèutic o valor discriminant. Per exemple, si l'interval terapèutic de la concentració de massa d'un fàrmac en el plasma és [50 – 100] mg/L, el valor per a la solució de treball de l'estàndard intern hauria d'estar comprès dins d'aquest interval (per ex.: 75 mg/L).

Sempre que sigui possible, cada vegada que es realitzin mesuraments interserials de la magnitud en estudi, s'ha de preparar una solució de treball d'estàndard intern nova, llevat que es pugui garantir que aquesta és estable en unes condicions d'emmagatzematge determinades.

Es pot veure un exemple de selecció d'estàndards interns i de preparació de les seves solucions a l'[Annex 2](#).

4.2. Calibratge i sensibilitat

Els principals procediments de quantificació que s'empren en l'HPLC són els procediments del patró extern, del patró intern, de normalització d'àrees i de l'addició estàndard (30, 88, 89). Qualsevol d'ells comporta la realització d'una sèrie de processos que poden afectar a totes les mostres per igual, inclosos els materials de calibratge, per la qual cosa, aquest fet s'haurà de tenir present quan es realitzi el calibratge del sistema cromatogràfic i, conseqüentment, en l'obtenció de la corba de calibratge.

Idealment, abans de dur a terme el procés de validació del sistema cromatogràfic, caldria conèixer quin serà l'interval de valors més probable de la magnitud en estudi ja que, aquest, ens permetrà decidir quin ha de ser l'interval de mesura del nostre sistema cromatogràfic i, per tant, saber quins valors han de presentar les solucions dels materials de calibratge que es preparin.

En la validació d'un sistema cromatogràfic, el procés de calibratge i l'obtenció de la corba de calibratge del sistema cromatogràfic estan subjectes a una sèrie de requisits (9, 20, 24, 25, 27-30):

- La corba de calibratge ha d'estar definida per un mínim de sis materials de calibratge (veure l'apartat 4.1.2). Addicionalment, s'han de preparar dos material de blanc (blanc), un que no contingui ni el component en estudi ni l'estàndard intern, i un altre que només contingui l'estàndard intern.
- El material de calibratge que presenta el valor més baix de la magnitud en estudi (calibrador 1) ha de tenir un valor que coincideixi amb el límit de quantificació.
- El material de calibratge que presenta el valor més alt de la magnitud (calibrador 6) ha de coincidir amb el límit superior de l'interval de mesura prèviament seleccionat.
- Els materials de calibratge i els materials de blanc s'han de processar per duplicat.
- Sempre que sigui possible, la corba de calibratge hauria d'estar representada per una funció matemàtica el més simple possible, és a dir, per l'equació d'una línia recta.

- Es pot fer servir qualsevol algorisme matemàtic que permeti ajustar la corba de calibratge (regressió lineal, polinòmica, múltiple, recíproca, logarítmica, exponencial, entre altres).
- Els valors obtinguts en els materials de blanc no s'han de tenir en compte en la realització de l'ajust matemàtic que representarà la corba de calibratge.
- Per a cada material de calibratge processat, s'ha de calcular la diferència relativa percentual entre el valor obtingut mitjançant l'ajust matemàtic (d'ara en endavant, valor obtingut) i el seu corresponent valor assignat (d'ara en endavant, valor teòric) dividit pel valor teòric. Aquesta diferència ha d'estar compresa entre $\pm 15\%$, excepte en el cas del calibrador 1 (calibrador amb un valor proper al del límit de quantificació) on aquesta diferència pot estar compresa entre $\pm 20\%$. Com a mínim, el 75 % dels materials de calibratge processats han de satisfer aquest requisit. A més, entre els duplicats d'un mateix material de calibratge, com a mínim un d'ells ha de complir aquest requisit. En cas que algun dels materials de calibratge no compleixi els requisits, aquest s'ha d'eliminar, s'ha de tornar a realitzar l'ajust de la corba de calibratge, s'ha de calcular novament les distintes diferències relatives percentuals i s'ha de comprovar que aquestes compleixen els esmentats requisits. En el cas en que cap dels duplicats dels materials de calibratge 1 i 6 compleixin els requisits, s'ha d'estudiar la possible causa del motiu de l'incompliment abans de continuar amb la validació del sistema cromatogràfic.
- S'ha d'enregistrar tota la informació referent al procés de calibratge:
 - El tipus de procediment de quantificació utilitzat (patró extern, patró intern, ...).
 - El tipus d'ajust matemàtic realitzat en la corba de calibratge (regressió lineal, regressió polinòmica, ...).
 - Els paràmetres que descriuen la corba de calibratge (per ex.: ordenada a l'origen i el pendent en cas que la corba segueixi l'equació d'una línia recta).
 - Els valors obtinguts, els valors teòrics i les diferències percentuals relatives obtingudes per a cada material de calibratge.
 - Totes les incidències aparegudes durant el procés de calibratge.

El terme i concepte "sensibilitat" no té cap relació amb els de la capacitat de detecció d'un sistema de mesura (valor crític, límit de detecció i límit de quantificació) i per tant, no s'haurien de fer servir com a sinònims. La sensibilitat [metrològica] d'un sistema cromatogràfic permet conèixer la capacitat de resposta instrumental enfront a un determinat valor de la magnitud relacionada amb l'analít. Un sistema cromatogràfic serà més sensible quan petites variacions en els valors de la magnitud donin lloc a una major resposta instrumental (senyal analític). En el cas que la corba de calibratge estigui caracteritzada per l'equació d'una línia recta, la sensibilitat correspondrà al valor del seu pendent.

4.3. Precisió de mesura. Repetibilitat i precisió en un laboratori

La precisió de mesura és una de les propietats metrològiques més importants a tenir en compte quan es valida un sistema cromatogràfic perquè, el coneixement quantitatiu d'aquesta propietat (imprecisió), és imprescindible per a l'establiment d'algorismes de control intern de la qualitat, per a la interpretació objectiva de la significació d'un canvi entre dos valors mesurats

consecutius d'una magnitud biològica en un pacient, i per al càlcul de la incertesa de mesura.

Dels tipus d'imprecisió existents, les de major interès en el laboratori clínic són la repetibilitat i la imprecisió en un laboratori (coneguda vulgarment com "imprecisió total"). Aquesta darrera conté la repetibilitat així com la imprecisió en condicions intermèdies (la imprecisió interserial i la imprecisió interdiària) (44-51).

4.3.1. Mostres per a l'estudi

Les mostres per a l'estudi poden ser mostres de pacients, una barreja de mostres de pacients que no contingui l'analít en qüestió (material de blanc)⁷ a la que se li ha afegit una quantitat determinada de l'analít a partir d'un material de referència certificat, o materials de control comercials sempre que es garanteixi que aquests són intercanviables amb les mostres de pacients (9, 20, 44-51).

Es recomana utilitzar, com a mínim, quatre mostres amb diferents valors de la magnitud biològica en estudi que cobreixin tot l'interval de mesura del sistema cromatogràfic. Per a sistemes cromatogràfics, es poden fer servir els materials de control preparats a l'apartat 4.1.2 d'aquest document, així com un material de valor baix amb un valor proper al del límit de quantificació (veure l'apartat 4.6.1 d'aquest document) (9, 20).

Totes les mostres s'han de conservar en unes condicions que assegurin l'estabilitat de la magnitud durant el temps que duri l'estudi, per la qual cosa és convenient distribuir-les en alíquotes i emmagatzemar-les a -80 °C.

4.3.2. Disseny experimental

Abans d'iniciar l'estudi es recomana realitzar un període de familiarització d'uns 5 dies, encara que aquest pot variar en funció de la complexitat del sistema cromatogràfic i de l'experiència de l'usuari. Posteriorment:

- 1) Per a cada dia del període en estudi (20 dies), s'han de realitzar dues sèries de mesura i , en cadascuna d'elles, processar per duplicat cada una de les mostres de manera que diàriament s'obtinguin quatre valors mesurats per mostra. Les dues sèries de mesura diàries s'han de realitzar amb una diferència mínima de dues hores i canviant l'ordre de processament de les mostres entre les sèries.
- 2) Després dels primers 5 dies de recollida de dades, s'han de realitzar els càlculs que es descriuen en els apartats següents i comprovar que els valors d'imprecisió obtinguts no superen el requisit establert prèviament pel laboratori (20 % —en el cas de la mostra amb un valor proper al del límit de quantificació— i 15 % per a la resta de mostres, seguint les recomanacions de l'EMA). Si els valors d'imprecisió superen aquest requisit, s'hauria d'interrompre l'estudi fins esbrinar i corregir la causa de l'incompliment.

Abans de realitzar cap càlcul, s'ha de comprovar que no existeixi cap valor aberrant, per exemple, utilitzant la prova paramètrica de Grubbs (<http://contchart.com/outliers.aspx>).

- 3) Per a cada una de les mostres, calcular la imprecisió intraserial (CV_i) a partir de les següents fórmules:

$$s_r = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^2 (x_{ij1} - x_{ij2})^2}{4 \cdot I}}$$

$$\bar{x}_i = \frac{\sum_{j=1}^2 \sum_{i=1}^I x_{ij}}{4 \cdot I}$$

$$CV_r = \frac{s_r}{\bar{x}_i} \cdot 100$$

on s_r = desviació estàndard intraserial, I = nombre total de dies (20), j = nombre de la sèrie diària (la 1 o la 2), x_{ij1} = valor mesurat del replicat 1, de la sèrie j del dia i , x_{ij2} = valor mesurat del replicat 2, de la sèrie j del dia i , x_{ij} = valor mesurat obtingut, i \bar{x}_i = mitjana de tots els valors mesurats.

- 4) Calcular la imprecisió en un laboratori (CV_i) utilitzant les següents fórmules:

$$A = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^I (\bar{x}_{i1} - \bar{x}_{i2})^2}{2 \cdot I}}$$

on I = nombre total de dies (20), \bar{x}_{i1} = mitjana dels dos replicats de la sèrie 1 del dia i , \bar{x}_{i2} = mitjana dels dos replicats de la sèrie 2 del dia i .

$$B = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^I (\bar{x}_i - \bar{x}_i)^2}{I - 1}}$$

on \bar{x}_i = mitjana dels valors mesurats obtinguts en el dia i , \bar{x}_i = mitjana de tots els valors mesurats.

A partir dels valors d' A i B , es calcula la desviació estàndard interdiària (s_b), la desviació estàndard interserial (s_{rr}) i la desviació estàndard en un laboratori (s_i) com segueix:

$$s_b^2 = B^2 - (A^2 / 2)$$

$$s_{rr}^2 = A^2 - (s_r^2 / 2)$$

$$s_i = \sqrt{s_b^2 + s_{rr}^2 + s_r^2}$$

$$CV_i = \frac{s_i}{\bar{x}_i} \cdot 100$$

Abans de realitzar cap càlcul, s'ha de comprovar que no existeixi cap valor aberrant, per exemple, utilitzant la prova paramètrica de Grubbs (<http://contchart.com/outliers.aspx>).

- 5) Comprovar que el valor d'imprecisió en un laboratori obtingut no supera el requisit d'imprecisió establert prèviament pel laboratori (20 % —en el cas de la mostra amb un valor proper al del límit de quantificació— i 15 % per a la resta de mostres, seguint les recomanacions de l'EMA).

A l'Annex 3, es pot trobar un full de càlcul amb un exemple de com dur a terme l'estudi de la precisió de mesura en un laboratori.

4.4. Veracitat de mesura. Biaix de mesura en un laboratori

A l'igual que la precisió de mesura, la veracitat de mesura és una de les propietats metrològiques més importants a tenir en compte quan es valida un sistema cromatogràfic perquè, el coneixement quantitatiu d'aquesta propietat (biaix de mesura), permet assegurar que els valors mesurats lliurats d'una magnitud

⁷ Veure la nota 5.

biològica són idonis per al seu ús previst (diagnòstic, pronòstic, seguiment o situació de risc d'una malaltia).

En aquest apartat s'estudia el biaix de mesura degut, principalment, al procés de calibratge. No es contempla el biaix:

- Degut a interferències per altres components de la mostra. Per al seu estudi, veure l'apartat 4.8 d'aquest document.
- Produït com a conseqüència d'una contaminació. Per al seu estudi, veure l'apartat 4.9 d'aquest document.
- Ocasionat per la utilització de mostres particulars. Per al seu estudi, veure l'apartat 4.10 d'aquest document.
- Entre sistemes de mesura.

4.4.1. Mostres per a l'estudi

Les mostres per a l'estudi, per ordre de preferència, haurien de ser:

- Una barreja de mostres de pacients que no contingui l'analít en qüestió (material de blanc)⁸ a la que se li ha afegit una quantitat determinada de l'analít a partir d'un material de referència certificat. Aquest material de referència hauria de presentar un valor assignat pel seu fabricant i amb una traçabilitat metrològica al Sistema Internacional d'Unitats. En els casos en què els materials de referència certificats ja estiguin preparats sobre la matriu biològica en estudi (per ex.: alguns materials de referència del NIST i l'OMS), les mostres per a l'estudi s'han de preparar seguint les instruccions proporcionades pel fabricant.
- Materials de control comercials, amb un valor assignat pel seu fabricant mitjançant un sistema i procediment de mesura de referència i amb una traçabilitat metrològica al Sistema Internacional d'Unitats. Aquests materials de control haurien de ser intercanviables amb les mostres de pacients.
- Materials de control comercials, amb un valor convencional corresponent a una mitjana o mediana consensual global per a valors mesurats no traçables a una unitat del Sistema Internacional d'Unitats. Aquests materials de control haurien de ser intercanviables amb les mostres de pacients.

Es recomana utilitzar, com a mínim, quatre mostres amb diferents valors de la magnitud biològica en estudi que cobreixin tot l'interval de mesura del sistema cromatogràfic. Per a sistemes cromatogràfics, es poden fer servir els materials de control preparats a l'apartat 4.1.2 d'aquest document, així com un material de valor baix amb un valor proper al del límit de quantificació (veure l'apartat 4.6.1 d'aquest document) (9, 20).

Totes les mostres s'han de conservar en unes condicions que assegurin l'estabilitat de la magnitud durant el temps que duri l'estudi, per la qual cosa és convenient distribuir-les en alíquotes i emmagatzemar-les a -80 °C.

4.4.2. Disseny experimental

Per a l'estudi del biaix de mesura:

- 1) Utilitzeu les dades recopilades en l'estudi de la precisió de mesura. Per poder-les emprar, cal que les mostres utilitzades siguin les mateixes que s'han fet servir en l'estudi de la precisió (veure l'apartat 4.3.1 d'aquest document).
- 2) Calcular el biaix de mesura en un laboratori (δ) utilitzant la següent fórmula:

$$\delta_r = \left(\frac{\bar{x}_t - \mu}{\mu} \right) 100$$

on \bar{x}_t = mitjana de tots els valors mesurats obtinguda en l'estudi de la precisió (veure l'apartat 4.3.2 d'aquest document) i μ = valor convencional corresponent a la mostra en estudi.

- 3) Comprovar que el valor del biaix de mesura en un laboratori obtingut no supera el requisit del biaix de mesura establert prèviament pel laboratori (20 % —en el cas de la mostra amb un valor proper al del límit de quantificació— i 15 % per a la resta de mostres, seguint les recomanacions de l'EMA).

A l'Annex 3, es pot trobar un full de càlcul amb un exemple de com dur a terme l'estudi del biaix de mesura en un laboratori.

4.5. Exactitud de mesura. Error de mesura

Per garantir la qualitat dels exàmens de laboratori ("anàlisis") que es realitzen als pacients és imprescindible la utilització de programes d'avaluació externa de la qualitat, que permetin conèixer l'error de mesura en comparar un valor mesurat de control amb el valor convencional corresponent a aquest material de control (73-77). Malauradament, per a la majoria de les magnituds biològiques que es mesuren mitjançant sistemes cromatogràfics, són poques les empreses que ofereixen programes d'avaluació externa de la qualitat per aquestes magnituds biològiques, obligant als laboratoris clínics a haver de recórrer a altres estratègies basades, principalment, en l'enviament de mostres a altres laboratoris i realitzar un estudi comparatiu dels valors mesurats obtinguts (78).

4.5.1. Estimació de l'error de mesura mitjançant la participació en programes d'avaluació externa de la qualitat

La participació en un programa d'avaluació externa de la qualitat s'ha de fer, sempre que sigui possible, seleccionant un programa que utilitzi materials de control amb valors assignats traçables a un procediment de mesura de la major qualitat metrològica possible (primari o de referència), i que tingui declarada la seva traçabilitat i la seva incertesa de mesura. Per altra banda, les magnituds biològiques incloses en els programes han de tenir valors propers als valors importants per a les decisions mèdiques, i han de ser tan semblants com sigui possible a les mostres dels pacients, tant pel que fa als components considerats com pel que fa a la matriu; per això és preferible que s'hagi demostrat la intercanviabilitat entre aquests dos tipus de materials (79).

Per a l'estimació de l'error de mesura mitjançant la participació en programes d'avaluació externa de la qualitat:

- 1) Processar els diferents materials de control intercalats entre les mostres de pacients.
- 2) Per a cada material de control, calcular l'error de mesura relatiu (e_{mr}) aplicant la fórmula següent:

$$e_{mr} = \left(\frac{x - \mu}{\mu} \right) 100$$

on x = valor mesurat obtingut per al material de control i μ = valor convencional.

L'Associació Catalana de Ciències de Laboratori Clínic (d'ara endavant, ACCLC) (79) recomana que la interpretació dels valors mesurats de control obtinguts en

⁸ Veure la nota 5.

l'avaluació externa de la qualitat es dugui a terme en funció de si, per a la interpretació clínica dels valors mesurats de les magnituds biològiques incloses en els programes, s'utilitzen valors discriminants universals, intervals terapèutics o valors de referència biològics i de si el laboratori coneix o no les propietats metroològiques dels seus sistemes de mesura. Així:

- Per a magnituds biològiques amb valors discriminants universals o intervals terapèutics:
 - μ = valor convencional assignat mitjançant un procediment primari o de referència o, en el seu defecte,
 - μ = valor convencional global (la mitjana ponderada de les mitjanes dels valors mesurats en el material de control per tots els laboratoris participants en el programa d'avaluació externa de la qualitat, amb independència del sistema de mesura que utilitzin).
- Per a magnituds biològiques amb valors de referència biològics establerts pel propi laboratori, o en col·laboració amb altres laboratoris, i produïts amb sistemes de mesura amb imprecisió interdiària i biaix coneguts:
 - μ = mateix tipus de valor convencional que es va fer servir per estimar el biaix durant el període de producció dels valors de referència.

NOTA: Els diferents tipus de valors poden ser:

 - Un valor convencional assignat mitjançant un procediment primari.
 - Un valor convencional assignat mitjançant un procediment de referència.
 - Un valor convencional global, és a dir, la mitjana ponderada de les mitjanes dels valors mesurats en el material de control per tots els laboratoris participants en un programa d'avaluació externa de la qualitat, amb independència del sistema de mesura que utilitzin.
 - Un valor convencional grupal, és a dir, la mitjana dels valors mesurats en aquests materials de control pels laboratoris participants en un programa que utilitzen els mateixos sistemes de mesura (i procediments de mesura) que el propi laboratori.
 - Un valor convencional assignat pel fabricant del material de control amb un sistema de mesura particular.
 - Un valor convencional igual a la mitjana dels valors assignats pel fabricant del material de control amb els diversos sistemes de mesura.
- Per a magnituds biològiques amb valors de referència biològics establerts pel propi laboratori, o en col·laboració amb altres laboratoris, i produïts amb sistemes de mesura amb imprecisió interdiària i biaix desconeguda:
 - μ = mateix tipus de valor convencional que es va fer servir per estimar el biaix durant el període de validació dels valors de referència.
- Per a magnituds biològiques amb valors de referència biològics adoptats i validats pel laboratori i produïts amb sistemes de mesura amb imprecisió interdiària i biaix coneguts:

- μ = mateix tipus de valor convencional que es va fer servir per estimar el biaix durant el període de validació dels valors de referència.

- Per a magnituds biològiques amb valors de referència biològics adoptats, validats o no, i produïts amb sistemes de mesura amb imprecisió interdiària i biaix desconeguts:

- μ = valor convencional grupal (la mitjana dels valors mesurats en aquests materials de control pels laboratoris participants en el programa que utilitzen els mateixos sistemes de mesura (i procediments de mesura).

- 3) Comprovar que el valor de l'error de mesura obtingut no supera el requisit de l'error de mesura establert prèviament pel laboratori.

L'ACCLC (15), considera que cada laboratori clínic ha de satisfer els requisits per a l'error de mesura establerts per l'organitzador del programa d'avaluació externa de la qualitat en que participi. Per altra banda, cal esmentar que, a la Unió Europea, s'han publicat diversos requisits sobre l'error de mesura corresponents a aquests tipus de programes (16-18).

4.5.2. Estimació de l'error de mesura quan no hi ha disponibles programes d'avaluació externa de la qualitat

Quan no es disposa de programes d'avaluació externa de la qualitat, es recomana que l'estudi i l'estimació de l'error de mesura es dugui a terme mitjançant l'enviament de diferents tipus de mostres a altres laboratoris i es realitzi un estudi comparatiu dels valors mesurats obtinguts (78).

Prèviament a la realització de l'estudi, el laboratori clínic ha de decidir la periodicitat de l'enviament de les mostres (per ex.: mensual, trimestral, semestral, anual), així com el nombre de mostres que s'inclouran en cada enviament. Es recomana que aquesta periodicitat sigui, com a mínim, semestral i que el nombre de mostres per enviament sigui de sis (tres mostres de pacients i tres materials de control) (78).

Per a l'estimació de l'error de mesura:

- 1) El mateix dia que el laboratori processa mostres de pacients, seleccionar-ne algunes que presentin valors fisiològics (o terapèutics) i patològics (o infra- o supra-terapèutics) de la magnitud en estudi.

Totes les mostres s'han de conservar en unes condicions que assegurin l'estabilitat de la magnitud, per la qual cosa és convenient distribuir-les en alíquotes i emmagatzemar-les a -80 °C.

- 2) Enviar les mostres, juntament amb els materials de control intern de la qualitat que es facin servir, a diferents laboratoris que mesurin la magnitud en qüestió mitjançant el mateix sistema o procediment cromatogràfic que utilitzi el nostre laboratori.

Cal tenir present que quan major sigui el nombre de laboratoris als que se'ls hi envii les mostres i els materials de control, més fiable serà l'estimació de l'error de mesura.

- 3) Per a cada mostra i material de control, calcular l'error de mesura relatiu (e_{mr}) aplicant la fórmula següent:

$$e_{mr} = \left(\frac{x - \mu}{\mu} \right) 100$$

on x = valor mesurat de la mostra o del material de control i μ = valor convencional grupal (la mitjana dels valors mesurats en aquestes mostres i materials de control pels laboratoris participants en l'estudi que utilitzen els mateixos sistemes de mesura o procediments de mesura.

- 4) Comprovar que el valor de l'error de mesura obtingut no supera el requisit de l'error de mesura establert prèviament pel laboratori.

A la Unió Europea, s'han publicat diversos requisits sobre l'error de mesura (16-18).

4.6. Capacitat de detecció. Valor crític, límit de detecció i límit de quantificació

Una de les propietats metrològiques que s'han d'estudiar quan es valida un sistema cromatogràfic és la capacitat de detecció. Aquesta es tracta d'una propietat qualitativa i per tant no presenta un valor numèric pel que es requereix del valor crític (L_C), el límit de detecció (L_D) i el límit de quantificació (L_Q) per obtenir una informació quantitativa relacionada amb aquesta propietat. El coneixement quantitatiu de la capacitat de detecció té especial interès als sistemes cromatogràfics on els valors d'importància clínica de les magnituds biològiques són propers als valors que defineixen la capacitat de detecció de l'esmentat sistema (3, 9, 20, 25, 35-46).

4.6.1. Mostres per a l'estudi

Les mostres necessàries per dur a terme l'estudi de la capacitat de detecció són (3, 9, 20, 25, 35-46):

- Un material de blanc. Es tracta d'un material que no conté l'analit en estudi de tal forma que el valor de la seva magnitud biològica és igual a zero. Per ordre de preferència, com a material de blanc, s'hauria de fer servir:
 - Una barreja de mostres de pacients que no hagin ingerit ni se'ls hi hagi subministrat l'analit en estudi; útil en casos d'analits que no es troben habitualment en una mostra (fàrmacs, drogues d'abús, entre altres). Es recomana utilitzar un mínim de 10 mostres.
 - Una solució de clorur sòdic 154 mmol/L i albúmina plasmàtica 50 g/L.
 - Una solució salina comercial.
 - Aigua qualitat HPLC o HPLC-MS.

Cal tenir present que quan major sigui la diferència entre les matrius dels materials de blanc i les mostres biològiques en estudi, major serà la infraestimació o sobreestimació del valor crític, límit de detecció i límit de quantificació.

- Un material de valor baix. Es tracta d'un material que conté l'analit en estudi de tal forma que el valor de la seva magnitud biològica és proper al límit de detecció o al límit de quantificació. Per ordre de preferència, com a material de valor baix, s'hauria d'emprar:
 - Una barreja de mostres de pacients amb un valor de la magnitud en estudi propera al límit de detecció. Es recomana utilitzar un mínim de 10 mostres.
 - Una barreja de mostres de pacients amb un valor conegut de la magnitud en estudi diluïda amb un material de blanc fins aconseguir un valor proper al límit de detecció o quantificació. Es recomana utilitzar un mínim de 10 mostres.
 - Un material de blanc al que se li ha afegit una quantitat determinada de l'analit en estudi a partir d'un material de referència fins aconseguir que el valor sigui proper al límit de detecció o quantificació.

Aquest material s'ha d'utilitzar i preparar únicament quan existeixi heterocedasticitat del sistema cromatogràfic a valors baixos de la magnitud biològica en estudi o quan es consideri necessari realitzar una estimació més exacta dels límits de detecció i quantificació.

Totes les mostres s'han de conservar en unes condicions que assegurin l'estabilitat de la magnitud durant el temps que duri l'estudi, per la qual cosa és convenient distribuir-les en alíquotes i emmagatzemar-les a $-80\text{ }^\circ\text{C}$.

4.6.2. Disseny experimental

Per a l'estudi del L_C , L_D i L_Q és necessari dur a terme un estudi de la precisió de mesura en un laboratori (veure l'apartat 4.3.2 d'aquest document) emprant com a mostres, el material de blanc i el material de valor baix, si pertoca (9, 20, 35).

4.6.3. Càlcul del valor crític, límit de detecció i límit de quantificació

Valor crític

Assumint que els valors obtinguts en el material de blanc es distribueixen seguint una distribució de Laplace-Gauss (distribució normal) amb una mitjana, 0, i una desviació estàndard, s_0 , el L_C es calcula com:

$$L_C = t_{(1-\alpha, r)} \cdot s_0 = 1,664 \cdot s_0$$

on $t_{(1-\alpha, r)}$ és l'àrea $1-\alpha$ d'una distribució de t -Student amb r graus de llibertat i un error de tipus I (α) determinat (al nostre cas $r = 79$, $\alpha = 0,05$ i l'àrea $1-\alpha = 1,664$) i s_0 és la desviació estàndard en un laboratori del sistema cromatogràfic obtinguda en el material de blanc.

NOTA: És necessari que el sistema cromatogràfic proporcioni tots els valors, independentment que aquests siguin positius o negatius. Si cal, s'han d'obtenir manualment utilitzant l'equació de la corba de calibratge. En cas de no poder disposar de tots els valors, s'ha de tenir en compte que pot existir una sobreestimació de la mitjana i, consegüentment, del valor crític.

Límit de detecció

Assumint que els valors obtinguts en el material de valor baix es distribueixen seguint una distribució normal amb una mitjana, \bar{x}_B , igual al L_C i una desviació estàndard s_B , el L_D es calcula com:

$$L_D = t_{(1-\alpha, r)} \cdot s_0 + t_{(1-\beta, r)} \cdot s_B = L_C + t_{(1-\beta, r)} \cdot s_B = L_C + 1,664 \cdot s_B$$

on L_C és el valor crític, $t_{(1-\beta, r)}$ és l'àrea $1-\beta$ d'una distribució de t -Student amb r graus de llibertat i un error tipus II (β) determinat (al nostre cas $r = 79$, $\beta = 0,05$ i l'àrea $1-\beta = 1,664$) i s_B és la desviació estàndard en un laboratori del sistema cromatogràfic obtinguda en el material de valor baix.

NOTA: Per a l'estudi del L_C , es pot fer servir el material de blanc enlloc del material de valor baix, llevat que se sospiti que existeix heterocedasticitat del sistema cromatogràfic a valors baixos de la magnitud biològica en estudi.

Si $\alpha = \beta = 0,05$, existeix homogeneïtat de variàncies (homocedasticitat) ($s_0^2 = s_B^2$) o es fa servir el material de blanc enlloc del material de valor baix, l'equació del L_D es pot simplificar a:

$$L_D = L_C + t_{(1-\beta, r)} \cdot s_0 = L_C + 1,664 \cdot s_0 = 3,33 \cdot s_0 = 2 \cdot L_C$$

Tot i que es troba implícit en l'equació del L_D , diferents guies (8, 9, 20, 30) especifiquen que un requisit que ha de complir el L_D és que el quocient entre el senyal analític del L_D i el senyal analític en absència del component en estudi (soroll) del sistema cromatogràfic sigui major o igual a 3, pel que és necessari que

aquesta premissa es compleixi abans de donar per vàlid el valor del L_D obtingut en l'estudi.

Límit de quantificació

Per al càlcul del L_Q , s'ha de decidir prèviament el valor d'impresió màxim permès ($CV_{M\grave{a}x}$). Seguint les recomanacions del CLSI (8), l'EMA (9) i l'Administració d'Aliments i Fàrmacs dels Estats Units (FDA) (20) que presenten guies gairebé específiques de sistemes cromatogràfics, recomanen un 20 %. El L_Q es calcula com:

$$L_Q = \frac{s_B}{CV_{M\grave{a}x}} \cdot 100$$

on s_B és la desviació estàndard en un laboratori del sistema cromatogràfic obtinguda en el material de valor baix.

NOTA: Per a l'estudi del L_Q , es pot fer servir el material de blanc enlloc del material de valor baix, llevat que se sospiti que existeix heterocedasticitat del sistema cromatogràfic a valors baixos de la magnitud biològica en estudi.

Si $CV_{M\grave{a}x} = 20\%$ i existeix homogeneïtat de variàncies ($s^2_0 = s^2_B$):

$$L_Q = 5 \cdot s_0$$

A l'igual que passa amb el L_D , diferents guies (8, 9, 20, 30) especifiquen que un requisit que ha de complir el L_Q és que el quocient entre el senyal analític (indicació) del L_Q i el soroll del sistema cromatogràfic sigui major o igual a 5, pel que és necessari que aquest es compleixi abans de donar per vàlid el valor del L_Q obtingut en l'estudi.

A l'Annex 4, es pot trobar un full de càlcul amb un exemple de com dur a terme l'estudi de la capacitat de detecció.

4.7. Interval de mesura. Linealitat

A l'igual que en qualsevol sistema de mesura, per als sistemes cromatogràfics és necessari estudiar l'interval de valors d'una magnitud biològica en el qual aquest pot ser aplicat sense haver de realitzar cap tipus d'acció, com per exemple, una dilució. El límit inferior de l'interval de mesura ve donat pel valor del límit de quantificació, mentre que el límit superior de l'interval de mesura correspon al valor per al material de calibratge que presenta un valor més alt (calibrador 6). Dins de l'interval de mesura és convenient que existeixi una relació lineal entre les indicacions (senyals analítics) que una magnitud biològica genera, mitjançant un fenomen fisicoquímic, i els seus valors. Per altra banda, l'interval de linealitat no pot ser superior a l'interval de mesura. Degut a aquestes dues assumpcions, és necessari que es realitzi un estudi de la linealitat per tal d'establir l'interval de linealitat d'un sistema de mesura (8, 9, 20, 19-27, 32-34).

4.7.1. Mostres per a l'estudi

Les mostres necessàries per dur a terme l'estudi de la linealitat són (8, 9, 20, 19-27, 32-34):

- Un material de blanc. Es tracta d'un material que no conté l'analít en estudi de tal forma que el valor de la seva magnitud biològica és igual a zero. Per ordre de preferència, com a material de blanc, s'hauria de fer servir:
 - Una barreja de mostres de pacients que no hagin ingerit ni se'ls hi hagi subministrat l'analít en estudi; útil en casos d'analít que no es troben habitualment en una mostra (fàrmacs, drogues d'abús, entre altres). Es recomana utilitzar un mínim de 10 mostres.
 - Una solució de clorur sòdic 154 mmol/L i albúmina plasmàtica 50 g/L.
 - Una solució salina comercial.
 - Aigua qualitat HPLC o HPLC-MS.

Cal tenir present que quan major sigui la diferència entre les matrius dels materials de blanc i les mostres biològiques en estudi, major serà la probabilitat d'obtenir una manca de linealitat.

- Un material de valor elevat. Es tracta d'un material que conté l'analít en estudi de tal forma que el valor de la seva magnitud biològica és major o igual al límit superior de l'interval de mesura prèviament preestablert. Per ordre de preferència, com a material de valor elevat, s'hauria d'emprar:
 - Una barreja de mostres de pacients amb un valor de la magnitud en estudi aproximadament 1,3 vegades el límit superior de l'interval de mesura. Es recomana utilitzar un mínim de 10 mostres.
 - Una barreja de mostres de pacients enriquida amb l'analít en estudi addicionant la substància pura o un material de referència, o bé, una solució concentrada de l'analít, fins aconseguir que el valor sigui proper al límit superior de l'interval de mesura. Per a sistemes cromatogràfics, es pot fer servir el material de calibratge 6 preparat a l'apartat 4.1.2 d'aquest document.

Totes les mostres s'han de conservar en unes condicions que assegurin l'estabilitat de la magnitud durant el temps que duri l'estudi, per la qual cosa és convenient distribuir-les en alíquotes i emmagatzemar-les a $-80\text{ }^\circ\text{C}$

4.7.2. Disseny experimental

Per a l'estudi de la linealitat:

- 1) Preparar un mínim de sis solucions fent servir el material de blanc (mostra I) i el material de valor elevat (mostra II) de la següent manera:
 - Solució A = 5 volums de la mostra I + 0 volums de la mostra II. El valor teòric per aquesta solució és el mateix que per a la mostra I (c_1). Es tracta d'una proporció 5:0.
 - Solució F = 0 volums de la mostra I + 5 volums de la mostra II. El valor teòric per aquesta solució és el mateix que per a la mostra II (c_6). Es tracta d'una proporció 0:5.
 - Solució B = 4 volums de la mostra I + 1 volum de la mostra II. El valor teòric (c_2) per aquesta solució serà $(4 \cdot c_1 + c_6)/5$. Es tracta d'una proporció 4:1.
 - Solució C = 3 volums de la mostra I + 2 volums de la mostra II. El valor teòric (c_3) per aquesta solució serà $(3 \cdot c_1 + 2 \cdot c_6)/5$. Es tracta d'una proporció 3:2.
 - Solució D = 2 volums de la mostra I + 3 volums de la mostra II. El valor teòric (c_4) per aquesta solució serà $(2 \cdot c_1 + 3 \cdot c_6)/5$. Es tracta d'una proporció 2:3.
 - Solució E = 1 volum de la mostra I + 4 volums de la mostra II. El valor teòric (c_5) per aquesta solució serà $(c_1 + 4 \cdot c_6)/5$. Es tracta d'una proporció 1:4.
- 2) Processar, aleatòriament i en una mateixa sèrie, cada una de les solucions per triplicat.
- 3) Per a cada solució, excepte per a la solució A, calcular la diferència relativa percentual entre el valor mesurat obtingut i el seu corresponent valor teòric dividit pel valor teòric. Seguint els criteris del CLSI (8), l'EMA (9) i la FDA (20), cada una de les diferències calculades ha d'estar compresa entre $\pm 15\%$.
- 4) Calcular la mitjana dels valors mesurats obtinguts per a cada solució i el coeficient de variació. Seguint els criteris

del CLSI (8), l'EMA (9) i la FDA (20), aquest coeficient de variació ha de ser $\leq 15\%$.

Abans de realitzar cap càlcul, s'ha de comprovar que no existeixi cap valor aberrant, per exemple, utilitzant la prova no paramètrica de Dixon (<http://contchart.com/outliers.aspx>).

- 5) Representar gràficament, els valors de les diferents mitjanes obtingudes (eix y) enfront els valors teòrics (eix x) de les solucions, per exemple, fent servir el programari MS Excel®.
- 6) Realitzar una inspecció visual de la gràfica i comprovar la seva linealitat:
 - a. Si s'observa una aparent linealitat, el límit superior de linealitat correspon al valor més elevat que es troba sobre el segment lineal de la gràfica.
 - b. Si la linealitat no és tan evident:
 - Realitzar una regressió lineal de tots els valors, per exemple, fent servir el programari MS Excel®.
 - NOTA: No s'ha de tenir en compte els valors de la solució A per dur a terme l'ajust de la recta de regressió.
 - Calcular, per a cada solució, la diferència entre els valors mitjans mesurats obtinguts i els valors teòrics calculats mitjançant l'equació de la recta de regressió.
 - Seguint els criteris d'acceptació del CLSI (33) i de la Societat Espanyola de Bioquímica i Patologia Molecular (SEQC) (32), es confirma la linealitat quan:
 - Els valors de les diferències oscil·len aleatòriament per damunt i davall del valor 0.
 - Els valors de les diferències estan compresos entre $\pm 15\%$.

A l'Annex 5, es pot trobar un full de càlcul amb un exemple de com dur a terme l'estudi de la linealitat.

4.8. Selectivitat

El sistema cromatogràfic ha de ser capaç de diferenciar l'analit en estudi i el seu estàndard intern d'altres components que es puguin trobar en la mostra. Per tal de verificar aquest requisit és necessari realitzar un estudi de la selectivitat (8, 9, 20, 56-64).

4.8.1. Mostres per a l'estudi

Les mostres necessàries per dur a terme l'estudi de la selectivitat són (8, 9, 20):

- Un material de valor baix. Es tracta d'un material que conté l'analit en estudi de tal forma que el valor de la seva magnitud biològica és proper al límit de quantificació. Per ordre de preferència, com a material de valor baix, s'hauria d'emprar:
 - Una barreja de mostres de pacients amb un valor de la magnitud en estudi proper al límit de quantificació. Es recomana utilitzar un mínim de 10 mostres.
 - Una barreja de mostres de pacients amb un valor conegut de la magnitud en estudi diluïda amb un material de blanc fins aconseguir un valor proper al límit de quantificació. Es recomana utilitzar un mínim de 10 mostres.
 - Un material de blanc al que se li ha afegit una quantitat determinada de l'analit en estudi a partir d'un material

de referència fins aconseguir que el valor sigui proper al límit de quantificació.

- Distintes mostres de pacients (un mínim de 6). Les diferents mostres de pacients no han de contenir l'analit en estudi ni el seu estàndard intern, però sí altres components que es cregui que podrien interferir en el mesurament de la magnitud en estudi. Per exemple, en el cas de l'estudi de magnituds relacionades amb fàrmacs, mostres que presentin alguns fàrmacs diferents al que es vol estudiar o que continguin algun o varis metabòlits del fàrmac en estudi.

Totes les mostres s'han de conservar en unes condicions que assegurin l'estabilitat de la magnitud durant el temps que duri l'estudi, per la qual cosa és convenient distribuir-les en alíquotes i emmagatzemar-les a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.8.2. Disseny experimental

Per a l'estudi de la selectivitat:

- 1) Processar la mostra de valor baix i les mostres de pacients.
- 2) Obtenir els diferents valors dels senyals analítics de totes les mostres processades. Habitualment, el senyal analític que es fa servir en els sistemes cromatogràfics són les àrees sota la corba del pic cromatogràfic o, en el seu defecte, l'alçada del pic cromatogràfic.
- 3) Comprovar que els valors de l'àrea sota la corba del pic cromatogràfic de les mostres en el temps de retenció de l'analit són inferiors al 20 % de l'àrea sota la corba del pic cromatogràfic de la mostra de valor baix en el temps de retenció de l'analit (seguint el criteri de l'EMA i la FDA).
- 4) Comprovar que els valors de l'àrea sota la corba del pic cromatogràfic de les mostres en el temps de retenció de l'estàndard intern són inferiors al 5 % de l'àrea sota la corba del pic cromatogràfic de la mostra de valor baix en el temps de retenció de l'estàndard intern (seguint els criteris de l'EMA i la FDA).

A l'Annex 6, es pot trobar un full de càlcul amb un exemple de com dur a terme l'estudi de la selectivitat.

4.9. Arrossegament o residualitat

Un dels estudis que s'ha de tenir present quan es valida un sistema cromatogràfic és la contaminació per arrossegament o residualitat (*carry-over* en anglès), donat que la seva existència pot donar lloc a valors falsament augmentats de la magnitud en estudi (8, 9, 20, 65).

4.9.1. Mostres per a l'estudi

Les mostres necessàries per dur a terme l'estudi de l'arrossegament són (8, 9, 20, 65):

- Un material de valor baix. Es tracta d'un material que conté l'analit en estudi de tal forma que el valor de la seva magnitud biològica és proper al límit de quantificació. Per ordre de preferència, com a material de valor baix, s'hauria d'emprar:
 - Una barreja de mostres de pacients amb un valor de la magnitud en estudi proper al límit de quantificació. Es recomana utilitzar un mínim de 10 mostres.
 - Una barreja de mostres de pacients amb un valor conegut de la magnitud en estudi diluïda amb un material de blanc fins aconseguir un valor proper al límit de quantificació. Es recomana utilitzar un mínim de 10 mostres.
 - Un material de blanc al que se li ha afegit una quantitat determinada de l'analit en estudi a partir d'un material de referència fins aconseguir que el valor sigui proper al límit de quantificació.

- Un material de blanc. Es tracta d'un material que no conté l'analít en estudi de tal forma que el valor de la seva magnitud biològica és igual a zero. Per ordre de preferència, com a material de blanc, s'hauria de fer servir:
 - Una barreja de mostres de pacients que no hagin ingerit ni se'ls hi hagi subministrat l'analít en estudi; útil en casos d'analít que no es troben habitualment en una mostra (fàrmacs, drogues d'abús, entre altres). Es recomana utilitzar un mínim de 10 mostres.
 - Una solució de clorur sòdic 154 mmol/L i albúmina plasmàtica 50 g/L.
 - Una solució salina comercial.
 - Aigua qualitat HPLC o HPLC-MS.
- Un material de valor elevat. Es tracta d'un material que conté l'analít en estudi de tal forma que el valor de la seva magnitud biològica és major o igual al límit superior de l'interval de mesura prèviament preestablert. Per ordre de preferència, com a material de valor elevat, s'hauria d'emprar:
 - Una barreja de mostres de pacients amb un valor de la magnitud en estudi aproximadament 1,3 vegades el límit superior de l'interval de mesura. Es recomana utilitzar un mínim de 10 mostres.
 - Una barreja de mostres de pacients enriquida amb l'analít en estudi addicionant la substància pura o un material de referència, o bé, una solució concentrada de l'analít, fins aconseguir que el valor sigui proper al límit superior de l'interval de mesura. Per a sistemes cromatogràfics, es pot fer servir el material de calibratge 6 preparat a l'apartat 4.1.2 d'aquest document.

Totes les mostres s'han de conservar en unes condicions que assegurin l'estabilitat de la magnitud durant el temps que duri l'estudi, per la qual cosa és convenient distribuir-les en alíquotes i emmagatzemar-les a -80 °C.

4.9.2. Disseny experimental

Per a l'estudi de l'arrossegament:

- 1) Processar les diferents mostres seguint el següent ordre:

*Material de valor baix – Material de valor elevat –
Materials de blanc (un mínim de 3)*

- 2) Obtenir els diferents valors dels senyals analítics de totes les mostres processades. Habitualment, el senyal analític que es fa servir en els sistemes cromatogràfics són les àrees sota la corba del pic cromatogràfic o, en el seu defecte, l'alçada del pic cromatogràfic.
- 3) Comprovar que els valors de l'àrea sota la corba del pic cromatogràfic de les mostres de blanc en el temps de retenció de l'analít són inferiors al 20 % de l'àrea sota la corba del pic cromatogràfic de la mostra de valor baix en el temps de retenció de l'analít (seguint el criteri de l'EMA i la FDA).
- 4) Comprovar que els valors de l'àrea sota la corba del pic cromatogràfic de les mostres en el temps de retenció de l'estàndard intern són inferiors al 5 % de l'àrea sota la corba del pic cromatogràfic de la mostra de valor baix en el temps de retenció de l'estàndard intern (seguint el criteri de l'EMA i la FDA).

De no complir-se aquests requisits, s'haurà de tenir present l'existència d'una contaminació per arrossegament quan es processin mostres de pacients, és dir, s'hauran d'intercalar materials de blanc entre mostres de pacients per evitar-la.

A l'Annex 7, es pot trobar un full de càlcul amb un exemple de com dur a terme l'estudi de la contaminació per arrossegament o residualitat.

4.10. Eficiència del procés cromatogràfic: recuperació i efecte matriu

L'eficiència d'un procés cromatogràfic depèn de la pèrdua de l'analít en estudi durant el procés d'extracció d'una mostra (recuperació) i de l'efecte combinat que els diferents components existents en una mostra poden exercir en el senyal analític de l'analít (efecte matriu) (8, 9, 20, 68-72). A més, aquest darrer efecte s'accentua en els sistemes de mesura basats en l'HPLC-MS o l'HPLC-MS/MS, com a conseqüència de l'efecte en el senyal analític que poden produir diferents substàncies al coeluir amb l'analít durant el procés d'ionització de la mostra. Per tots aquests motius, és necessari dur a terme un estudi de la recuperació, de l'efecte matriu i, en conseqüència, de l'eficiència del procés cromatogràfic.

L'estudi de la recuperació es basa en la comparació del senyal analític de l'analít obtingut en mostres de blanc de pacients a les que s'ha afegit l'analít en estudi abans i després de la realització d'un procés d'extracció. Per altra banda, en l'estudi de l'efecte matriu es compara el senyal de l'analít obtingut en mostres de blanc de pacients (matriu en estudi) a les que s'ha afegit l'analít en estudi després de la realització d'un procés d'extracció, amb l'obtingut en materials de referència de l'analít dissolts en un dissolvent —fase mòbil— (sense matriu).

4.10.1. Mostres per a l'estudi

Les mostres necessàries per dur a terme l'estudi de l'efecte matriu són (8, 9, 20, 68-72):

- Un mínim de 6 mostres de blanc de pacients. Es tracten de mostres de pacient que no contenen l'analít en qüestió⁹.
- Extracte de les mostres de blanc de pacients. S'obté realitzant el procés d'extracció cromatogràfic (el que es vagi a fer servir) en les mostres de blanc de pacients.
- Material de referència certificat de l'analít, dels quals es conegui la seva puresa o riquesa, la seva traçabilitat (a poder ser al Sistema Internacional d'Unitats) i la seva incertesa de mesura.
- Material d'elevada puresa o riquesa de l'estàndard intern.

4.10.2. Preparació de solucions de treball

4.10.2.1. Preparació de solucions de treball de l'analít a partir de mostres de pacients

Per a la preparació de les solucions de treball de l'analít en mostres de blanc de pacients:

- 1) A partir del material de referència certificat, preparar una solució primària de l'analít en un dissolvent apropiat (aigua, metanol o acetonitril, depenent de la solubilitat de l'analít).
NOTA: Es pot fer servir la mateixa solució primària per als materials de control preparada a l'apartat 4.1.2 d'aquest document.
- 2) Preparar tres solucions secundàries, en aigua qualitat HPLC o HPLC-MS, que presentin 10 vegades el valor teòric dels materials de control a utilitzar.
- 3) Per a cada mostra de pacient, preparar tres solucions de treball (solució 1, solució 2 i solució 3) afegint 1 part de

⁹ Només en el cas que l'analít no es trobi en el líquid biològic, per exemple, en el cas dels fàrmacs. Si l'analít es troba en el líquid biològic, és a dir, és un component biològic, és recomanable fer servir mostres de pacients que presentin un valor de la magnitud en estudi el més baix possible (8, 9, 20).

volum de la corresponent solució secundària sobre 9 parts de volum de la mostra de blanc de pacient que no conté l'analit en qüestió (dilució 1/10).

4.10.2.2. Preparació de solucions de treball de l'analit a partir de l'extracte de les mostres de blanc de pacients

Per a la preparació de les solucions de treball de l'analit en l'extracte de les mostres de blanc de pacients:

- 1) A partir del material de referència certificat, preparar una solució primària de l'analit en un dissolvent apropiat (aigua, metanol o acetonitril, depenent de la solubilitat de l'analit).

NOTA: Es pot fer servir la mateixa solució primària per als materials de control preparada a l'apartat 4.1.2 d'aquest document.

- 2) Preparar tres solucions secundàries, en aigua qualitat HPLC o HPLC-MS, que presentin 10 vegades el valor teòric dels materials de control a utilitzar.
- 3) Per a cada mostra de pacient, preparar tres solucions de treball (solució 4, solució 5 i solució 6) afegint 1 part de volum de la corresponent solució secundària sobre 9 parts de volum de l'extracte de la mostra de blanc de pacient que no conté l'analit en qüestió (dilució 1/10).

NOTA: els valors per aquestes solucions seran els mateixos que els de les solucions preparades a l'apartat 4.10.2.1 després de la realització del procés d'extracció:

- El valor per a la solució 4 = el valor per a la solució 1.
- El valor per a la solució 5 = el valor per a la solució 2.
- El valor per a la solució 6 = el valor per a la solució 3.

4.10.2.3. Preparació de solucions de treball de l'analit a partir d'un dissolvent (fase mòbil)

Per a la preparació de les solucions de treball de l'analit en un dissolvent (fase mòbil):

- 1) A partir del material de referència certificat, preparar una solució primària de l'analit en un dissolvent apropiat (aigua, metanol o acetonitril, depenent de la solubilitat de l'analit).

NOTA: Es pot fer servir la mateixa solució primària per als materials de control preparada a l'apartat 4.1.2 d'aquest document.

- 2) Preparar tres solucions secundàries, en aigua qualitat HPLC o HPLC-MS, que presentin 10 vegades el valor teòric dels materials de control a utilitzar.
- 3) Realitzar una dilució 1/10 de cada una de les tres solucions secundàries, en la fase mòbil que s'emprarà en el procediment cromatogràfic, afegint 1 part de volum de la corresponent solució secundària sobre 9 parts de volum de la fase mòbil (solució 7, solució 8 i solució 9).

NOTA: els valors per aquestes solucions seran els mateixos que els de les solucions preparades a l'apartat 4.10.2.1 després de la realització del procés d'extracció:

- El valor per a la solució 7 = el valor per a la solució 1.
- El valor per a la solució 8 = el valor per a la solució 2.
- El valor per a la solució 9 = el valor per a la solució 3.
- El valor per a la solució 6 = el valor per a la solució 3.

4.10.2.4. Preparació de solucions de treball d'estàndard intern a partir de mostres de blanc de pacients

El procediment de preparació de solucions de treball d'un o varis estàndards en mostres de blanc de pacients:

- 1) A partir del material d'elevada puresa o riquesa de l'estàndard intern, preparar una solució primària d'estàndard intern en un dissolvent apropiat (aigua, metanol o acetonitril, depenent de la seva solubilitat).

NOTA: Es pot fer servir la mateixa solució primària d'estàndard intern preparada a l'apartat 4.1.3 d'aquest document.

- 2) Preparar una solució secundària d'estàndard intern, en aigua qualitat HPLC o HPLC-MS, que presenti 10 vegades el valor de la solució de treball d'estàndard intern preparada a l'apartat 4.1.3 d'aquest document.
- 3) Per a cada mostra de pacient, preparar una solució de treball (solució 10) afegint 1 part de volum de la solució secundària d'estàndard intern sobre 9 parts de volum de la mostra de blanc de pacient que no conté l'analit en qüestió (dilució 1/10).

4.10.2.5. Preparació de solucions de treball d'estàndard intern a partir de l'extracte de mostres de blanc de pacients

El procediment de preparació de solucions de treball d'un o varis estàndards en l'extracte de les mostres de blanc de pacients:

- 1) A partir del material d'elevada puresa o riquesa de l'estàndard intern, preparar una solució primària d'estàndard intern en un dissolvent apropiat (aigua, metanol o acetonitril, depenent de la seva solubilitat).

NOTA: Es pot fer servir la mateixa solució primària d'estàndard intern preparada a l'apartat 4.1.3 d'aquest document.

- 2) Preparar una solució secundària d'estàndard intern, en aigua qualitat HPLC o HPLC-MS, que presenti 10 vegades el valor de la solució de treball d'estàndard intern preparada a l'apartat 4.1.3 d'aquest document.
- 3) Per a cada mostra de pacient, preparar una solució de treball (solució 11) afegint 1 part de volum de la solució secundària d'estàndard intern sobre 9 parts de volum de l'extracte de la mostra de blanc de pacient que no conté l'analit en qüestió (dilució 1/10).

NOTA: El valor per aquesta solució serà la mateixa que el de la solució preparada a l'apartat 4.10.2.4 després de la realització del procés d'extracció (El valor per a la solució 11 = el valor per a la solució 10).

4.10.2.6. Preparació de solucions de treball de l'estàndard intern a partir d'un dissolvent (fase mòbil)

El procediment de preparació d'una solució d'un o varis estàndards en un dissolvent (fase mòbil):

- 1) A partir del material d'elevada puresa o riquesa de l'estàndard intern, preparar una solució primària d'estàndard intern en un dissolvent apropiat (aigua, metanol o acetonitril, depenent de la seva solubilitat).

NOTA: Es pot fer servir la mateixa solució primària d'estàndard intern preparada a l'apartat 4.1.3 d'aquest document.

- 2) Preparar una solució secundària d'estàndard intern, en aigua qualitat HPLC o HPLC-MS, que presenti 10 vegades el valor de la solució de treball d'estàndard intern preparada a l'apartat 4.1.3 d'aquest document.
- 3) Realitzar una dilució 1/10 de la solució secundària d'estàndard intern (solució 12), en la fase mòbil que s'emprarà en el procediment cromatogràfic, afegint 1 part de volum de la solució secundària sobre 9 parts de volum de la fase mòbil.

NOTA: El valor per aquesta solució serà la mateixa que el de la solució preparada a l'apartat 4.10.2.4 després de la realització del procés d'extracció (El valor per a la solució 12 = el valor per a la solució 10).

4.10.3. Disseny experimental

Per a l'estudi de l'eficiència del procés cromatogràfic:

- 1) Processar, aleatòriament i en una mateixa sèrie, totes les solucions de treball realitzades.

NOTA: Per a les solucions de treball preparades en l'extracte de les mostres de blanc de pacients i en la fase mòbil, NO s'ha de realitzar-ne el procés d'extracció, és a dir, s'introdueixen directament en el sistema cromatogràfic i es processen.

- 2) Obtenir els diferents valors dels senyals analítics de totes les solucions processades. Habitualment, el senyal analític que es fa servir en els sistemes cromatogràfics són les àrees sota la corba del pic cromatogràfic o, en el seu defecte, l'alçada del pic cromatogràfic.

4.10.4. Càlcul de la recuperació, l'efecte matriu i l'eficiència del procés cromatogràfic

Recuperació

Per a conèixer la recuperació del procés cromatogràfic, s'ha de calcular el percentatge de recuperació (RE) per a totes les mostres de pacients utilitzant les següents fórmules:

$$RE_{m_i(1-4)}(\%) = \left(\frac{A_{\text{Solució 1}}}{A_{\text{Solució 4}}} \right) \cdot 100$$

$$RE_{m_i(2-5)}(\%) = \left(\frac{A_{\text{Solució 2}}}{A_{\text{Solució 5}}} \right) \cdot 100$$

$$RE_{m_i(3-6)}(\%) = \left(\frac{A_{\text{Solució 3}}}{A_{\text{Solució 6}}} \right) \cdot 100$$

$$RE_{m_i(10-11)}(\%) = \left(\frac{A_{\text{Solució 10}}}{A_{\text{Solució 11}}} \right) \cdot 100$$

on $m_i(1-4)$ = mostra del pacient i per al valor de la solució 1 i 4, $m_i(2-5)$ = mostra de blanc del pacient i per al valor de la solució 2 i 5, $m_i(3-6)$ = Mostra de blanc del pacient i per al valor de la solució 3 i 6, $m_i(10-11)$ = Mostra de blanc del pacient i per al valor de la solució 10 i 11, $A_{\text{Solució 1}}$ = Àrea sota la corba del pic cromatogràfic obtinguda en una solució 1, $A_{\text{Solució 2}}$ = Àrea sota la corba del pic cromatogràfic obtinguda en una solució 2, $A_{\text{Solució 3}}$ = Àrea sota la corba del pic cromatogràfic obtinguda en una solució 3, $A_{\text{Solució 4}}$ = Àrea sota la corba del pic cromatogràfic obtinguda en una solució 4, $A_{\text{Solució 5}}$ = Àrea sota la corba del pic cromatogràfic obtinguda en una solució 5, $A_{\text{Solució 6}}$ = Àrea sota la corba del pic cromatogràfic obtinguda en una solució 6, $A_{\text{Solució 10}}$ = Àrea sota la corba del pic cromatogràfic obtinguda en una solució 10, $A_{\text{Solució 11}}$ = Àrea sota la corba del pic cromatogràfic obtinguda en una solució 11.

Per tal de conèixer si l'estàndard intern és capaç de compensar la possible pèrdua d'analít durant el procés d'extracció de la mostra, s'ha de calcular el percentatge de recuperació normalitzat (n-RE) per a totes les mostres de pacients emprant les següents fórmules:

$$n - RE_{m_i(1-4)}(\%) = \left(\frac{A_{\text{Solució 1}}/A_{\text{Solució 10}}}{A_{\text{Solució 4}}/A_{\text{Solució 11}}} \right) \cdot 100 = \frac{RE_{m_i(1-4)}}{RE_{m_i(10-11)}} \cdot 100$$

$$n - RE_{m_i(2-5)}(\%) = \left(\frac{A_{\text{Solució 2}}/A_{\text{Solució 10}}}{A_{\text{Solució 5}}/A_{\text{Solució 11}}} \right) \cdot 100 = \frac{RE_{m_i(2-5)}}{RE_{m_i(10-11)}} \cdot 100$$

$$n - RE_{m_i(3-6)}(\%) = \left(\frac{A_{\text{Solució 3}}/A_{\text{Solució 10}}}{A_{\text{Solució 6}}/A_{\text{Solució 11}}} \right) \cdot 100 = \frac{RE_{m_i(3-6)}}{RE_{m_i(10-11)}} \cdot 100$$

Una vegada realitzats els càlculs per a la recuperació, s'ha de comprovar que els valors dels percentatges de recuperació de l'analít per a totes les mostres de pacients són semblants entre si. Idealment, cada un d'aquests valors hauria d'estar comprès entre $(100 \pm 15) \%$. Tot i que no és necessari que aquests valors estiguin inclosos dins d'aquest interval, seguint els criteris del CLSI (8), l'EMA (9) i la FDA (20), si és necessari que aquests siguin independents dels valors de la magnitud en estudi (existeixi una diferència percentual màxima del 15 % entre ells) i reproduïbles, és a dir, que el valor del percentatge de recuperació conjunt o global (mitjana de tots els valors de recuperació de l'analít estudiats) presenti un coeficient de variació $\leq 15 \%$.

Per altra banda, seguint els criteris del CLSI (8), l'EMA (9) i la FDA (20), s'ha de comprovar que els valors dels percentatges de recuperació normalitzats, independentment del valor de la magnitud, estan compresos entre $(100 \pm 15) \%$. A més, el valor del percentatge de recuperació normalitzat conjunt o global, calculat com la mitjana de tots els dels percentatges de recuperació normalitzats, ha de presentar un coeficient de variació $\leq 15 \%$. Si no es compleixen aquests requisits, s'hauria de plantejar la selecció d'un altre estàndard intern, donat que la seva addició no compensaria la manca de recuperació de l'analít.

Efecte matriu

Per a conèixer l'efecte matriu, s'ha de calcular el percentatge del factor de matriu (MF) o el percentatge d'efecte matriu (ME) per a totes les mostres utilitzant les següents fórmules:

$$MF_{m_i(4-7)}(\%) = \left(\frac{A_{\text{Solució 4}}}{A_{\text{Solució 7}}} \right) \cdot 100$$

$$ME_{m_i(4-7)}(\%) = \left(\frac{A_{\text{Solució 4}} - A_{\text{Solució 7}}}{A_{\text{Solució 7}}} \right) \cdot 100$$

$$MF_{m_i(5-8)}(\%) = \left(\frac{A_{\text{Solució 5}}}{A_{\text{Solució 8}}} \right) \cdot 100$$

$$ME_{m_i(5-8)}(\%) = \left(\frac{A_{\text{Solució 5}} - A_{\text{Solució 8}}}{A_{\text{Solució 8}}} \right) \cdot 100$$

$$MF_{m_i(6-9)}(\%) = \left(\frac{A_{\text{Solució 6}}}{A_{\text{Solució 9}}} \right) \cdot 100$$

$$ME_{m_i(6-9)}(\%) = \left(\frac{A_{\text{Solució 6}} - A_{\text{Solució 9}}}{A_{\text{Solució 9}}} \right) \cdot 100$$

$$MF_{m_i(11-12)}(\%) = \left(\frac{A_{\text{Solució 11}}}{A_{\text{Solució 12}}} \right) \cdot 100$$

$$ME_{m_i(11-12)}(\%) = \left(\frac{A_{\text{Solució 11}} - A_{\text{Solució 12}}}{A_{\text{Solució 12}}} \right) \cdot 100$$

on $m_i(4-7)$ = mostra de blanc del pacient i per al valor de la solució 4 i 7, $m_i(5-8)$ = mostra de blanc del pacient i per al valor de la solució 5 i 8, $m_i(6-9)$ = Mostra de blanc del pacient i per al valor de la solució 6 i 9, $m_i(11-12)$ = Mostra de blanc del pacient i per al valor de la solució 11 i 12, $A_{\text{Solució 4}}$ = Àrea sota la corba del pic cromatogràfic obtinguda en una solució 4, $A_{\text{Solució 5}}$ = Àrea sota la corba del pic cromatogràfic obtinguda

en una solució 5, $A_{\text{Solució } 6}$ = Àrea sota la corba del pic cromatogràfic obtinguda en una solució 6, $A_{\text{Solució } 7}$ = Àrea sota la corba del pic cromatogràfic obtinguda en una solució 7, $A_{\text{Solució } 8}$ = Àrea sota la corba del pic cromatogràfic obtinguda en una solució 8, $A_{\text{Solució } 9}$ = Àrea sota la corba del pic cromatogràfic obtinguda en una solució 9, $A_{\text{Solució } 11}$ = Àrea sota la corba del pic cromatogràfic obtinguda en una solució 11, $A_{\text{Solució } 12}$ = Àrea sota la corba del pic cromatogràfic obtinguda en una solució 12.

Un percentatge del factor de matriu < 100 % o un percentatge d'efecte matriu negatiu indica que la matriu de la mostra provoca que disminueixi el senyal analític de l'analít —existeix un efecte de supressió iònica si s'utilitzen sistemes cromatogràfics basats en l'HPLC-MS o l'HPLC-MS/MS—. Per altra banda, un percentatge del factor de matriu > 100 % o un percentatge d'efecte matriu positiu indica que la matriu de la mostra provoca que augmenti el senyal analític de l'analít —existeix un efecte de sobre-expressió iònica si s'empren sistemes cromatogràfics basats en l'HPLC-MS o l'HPLC-MS/MS—.

Per tal d'estudiar si l'estàndard intern és capaç de compensar el possible efecte matriu que es pugui produir durant el procés cromatogràfic, s'ha de calcular el percentatge del factor de matriu normalitzat (n-MF) per a totes les mostres utilitzant les següents fórmules:

$$n - MF_{m_i(4-7)}(\%) = \left(\frac{A_{\text{Solució } 4} / A_{\text{Solució } 11}}{A_{\text{Solució } 7} / A_{\text{Solució } 12}} \right) \cdot 100 = \frac{MF_{m_i(1-4)}}{MF_{m_i(11-12)}} \cdot 100$$

$$n - MF_{m_i(5-8)}(\%) = \left(\frac{A_{\text{Solució } 5} / A_{\text{Solució } 11}}{A_{\text{Solució } 8} / A_{\text{Solució } 12}} \right) \cdot 100 = \frac{MF_{m_i(5-8)}}{MF_{m_i(11-12)}} \cdot 100$$

$$n - MF_{m_i(6-9)}(\%) = \left(\frac{A_{\text{Solució } 6} / A_{\text{Solució } 11}}{A_{\text{Solució } 9} / A_{\text{Solució } 12}} \right) \cdot 100 = \frac{MF_{m_i(6-9)}}{MF_{m_i(11-12)}} \cdot 100$$

Una vegada realitzats els càlculs per a l'efecte matriu, s'ha de comprovar que els valors dels percentatges dels factors de matriu de l'analít per a totes les mostres de pacients són semblants entre sí. Idealment, cada un d'aquests valors hauria d'estar comprès entre (100 ± 15) %. Tot i que no és necessari que aquests valors estiguin inclosos dins d'aquest interval, seguint els criteris del CLSI (8), l'EMA (9) i la FDA (20), sí és necessari que aquests siguin independents dels valors de la magnitud en estudi (existeixi una diferència percentual màxima del 15 % entre ells) i reproduïbles, és a dir, que el valor del percentatge del factor de matriu conjunt o global (mitjana de tots els valors de factor matriu de l'analít estudiats) presenti un coeficient de variació ≤ 15 %.

Per altra banda, seguint els criteris del CLSI (8), l'EMA (9) i la FDA (20), s'ha de comprovar que els valors dels percentatges dels factors de matriu normalitzats, independentment del valor de la magnitud, estan compresos entre (100 ± 15) %. A més el valor del factor de matriu normalitzat conjunt o global, calculat com la mitjana de tots els valors dels factors de matriu normalitzats, ha de presentar un coeficient de variació ≤ 15 %. Si no es compleixen aquests requisits seria necessari seleccionar un altre estàndard intern i realitzar novament l'estudi de l'efecte matriu, donat que l'estàndard intern escollit no és capaç de compensar l'efecte matriu.

Eficiència del procés cromatogràfic

L'eficiència d'un procés cromatogràfic (PE) i l'eficiència normalitzada d'un procés cromatogràfic (n-PE) es poden calcular com:

$$PE(\%) = \frac{MF(\%) \cdot RE(\%)}{100}$$

$$n - PE(\%) = \frac{n - MF(\%) \cdot n - RE(\%)}{100}$$

Per tant:

$$PE_{m_i(10-12)}(\%) = \left(\frac{A_{\text{Solució } 10}}{A_{\text{Solució } 12}} \right) \cdot 100$$

$$PE_{m_i(1-7)}(\%) = \left(\frac{A_{\text{Solució } 1}}{A_{\text{Solució } 7}} \right) \cdot 100$$

$$n - PE_{m_i(1-7)}(\%) = \frac{PE_{m_i(1-7)}}{PE_{m_i(10-12)}} \cdot 100$$

$$PE_{m_i(2-8)}(\%) = \left(\frac{A_{\text{Solució } 2}}{A_{\text{Solució } 8}} \right) \cdot 100$$

$$n - PE_{m_i(2-8)}(\%) = \frac{PE_{m_i(2-8)}}{PE_{m_i(10-12)}} \cdot 100$$

$$PE_{m_i(3-9)}(\%) = \left(\frac{A_{\text{Solució } 3}}{A_{\text{Solució } 9}} \right) \cdot 100$$

$$n - PE_{m_i(3-9)}(\%) = \frac{PE_{m_i(3-9)}}{PE_{m_i(10-12)}} \cdot 100$$

A l'Annex 8, es pot trobar un full de càlcul amb un exemple de com dur a terme l'estudi de l'eficiència del procés cromatogràfic.

4.11. Estabilitat

Quan es valida un sistema cromatogràfic s'ha de dur a terme un estudi de l'estabilitat per tal d'assegurar que, durant la preparació de les mostres i en el seu processament així com en les condicions d'emmagatzematge usades, no es veuen afectats els valors de les magnituds relacionades amb l'analít. En general, l'estudi de l'estabilitat es realitza comparant els valors obtinguts en diferents tipus de mostres que contenen l'analít en estudi, emmagatzemades durant distints períodes de temps i en diferents condicions. Per altra banda, les condicions en què es realitza l'estudi de l'estabilitat —les matrius utilitzades, els recipients de mostra que es faran servir, les condicions i temps d'emmagatzematge, entre altres— han de ser similars a les que s'utilitzaran quan es processin mostres de pacients (8, 9, 20, 82-87).

El CLSI (8), l'EMA (9) i la FDA (10) recomanen que es realitzi:

- L'estudi de l'estabilitat en les diferents solucions primàries, secundàries i de treball preparades per a l'analít i l'estàndard intern, sota les condicions en que s'emmagatzemaran.
- L'estudi de l'estabilitat a curt termini en la matriu en estudi a temperatura ambient o a la temperatura de processament de les mostres.

- L'estudi de l'estabilitat a llarg termini en la matriu en estudi a una temperatura de congelació (-20 °C o -80 °C).
- L'estudi del nombre de cicles de congelació-descongelació en la matriu en estudi que permetin assegurar l'estabilitat de la magnitud en estudi.
- L'estudi de l'estabilitat a curt termini en mostres de pacients a temperatura ambient o sota les seves condicions d'emmagatzematge.
- L'estudi de l'estabilitat en el mostrejador del sistema cromatogràfic per a l'extracte de la matriu en estudi a temperatura ambient o sota les seves condicions d'emmagatzematge.

4.11.1. Mostres per a l'estudi

Les mostres necessàries per dur a terme els estudis d'estabilitat són (8, 9, 20):

- Solucions primària i secundàries de l'analit en estudi. Es pot fer servir el mateix procediment de preparació emprat a l'apartat 4.1.2 d'aquest document.
- Solucions primària i de treball de l'estàndard intern. Es pot fer servir el mateix procediment de preparació emprat a l'apartat 4.1.3 d'aquest document.
- Una barreja de mostres de pacients que no contingui l'analit en qüestió (material de blanc)¹⁰ a la que se li han afegit diferents quantitats de l'analit a partir d'un material de referència certificat. Es poden fer servir els materials de control, seguint el procediment de preparació dels mateixos de l'apartat 4.1.2.
- Extractes de la barreja de mostres de pacients que no contingui l'analit en qüestió (material de blanc)¹⁰ a la que se li ha afegit una quantitat determinada de l'analit a partir d'un material de referència certificat. S'obtenen després de realitzar el procés d'extracció cromatogràfic.
- Mostres de pacients (un mínim de 20) que continguin l'analit en estudi.

4.11.2. Disseny experimental

4.11.2.1. Estudi de l'estabilitat en les diferents solucions primàries, secundàries i de treball

Per dur a terme aquest estudi de l'estabilitat:

- 1) Decidir el període de temps i les condicions d'emmagatzematge de les solucions.
- 2) Preparar les diferents solucions i emmagatzemar-les durant el període de temps i sota les condicions prèviament escollides.

NOTA: Habitualment:

- Les solucions primàries i secundàries de l'analit i l'estàndard intern s'emmagatzemen a -80 °C o, en el seu defecte, a -30 °C durant distints períodes de temps que oscil·len entre un i sis mesos.
- Les solucions de treball de l'analit i l'estàndard intern s'emmagatzemen refrigerades (2-8 °C) durant diferents períodes de temps que oscil·len entre un i quinze dies.

- 3) Una vegada transcorregut el període de temps d'emmagatzematge de les solucions, després de temperar-les i agitar-les, es processen aleatòriament i en una mateixa sèrie un mínim de sis vegades.

- 4) Per a cada solució, calcular la diferència relativa percentual (*PD*) utilitzant la següent fórmula:

$$PD (\%) = \frac{100}{n} \cdot \sum_{i=1}^n \left(\frac{X_i - Y}{Y} \right)$$

on X_i és cada un dels valors mesurats obtinguts en la solució, Y és el valor teòric o nominal de la solució i n és el nombre de vegades que s'ha processat la solució i ($n = 6$ en el nostre cas).

Seguint els criteris del CLSI (8), l'EMA (9) i la FDA (20), es considera que la magnitud en estudi és estable si la diferència relativa percentual *PD* està compresa entre ± 15 %.

Abans de realitzar cap càlcul, s'ha de comprovar que no existeixi cap valor aberrant, per exemple, utilitzant la prova no paramètrica de Dixon (<http://contchart.com/outliers.aspx>).

4.11.2.2. Estudi de l'estabilitat a curt i llarg termini

Per dur a terme aquests estudis de l'estabilitat:

- 1) Per als materials de control preparats, decidir els períodes de temps de cada un dels estudis.
- 2) Preparar els materials de control i emmagatzemar-los, a temperatura ambient (per a l'estudi a curt termini) i a temperatura de congelació de -20 °C o -80 °C (per a l'estudi a llarg termini) durant el període de temps escollit.
NOTA: Habitualment, els diferents períodes de temps en estudi solen estar compresos entre un i quinze dies per a l'estudi a curt termini, i entre un mes i sis mesos per a l'estudi a llarg termini.
- 3) Una vegada transcorreguts els períodes de temps d'emmagatzematge dels materials de control, i després de temperar-los i agitar-los, es processen aleatòriament i en una mateixa sèrie un mínim de sis vegades.
- 4) Per a cada material de control i estudi d'estabilitat, calcular la diferència relativa percentual (*PD*) utilitzant la següent fórmula:

$$PD (\%) = \frac{100}{n} \cdot \sum_{i=1}^n \left(\frac{X_i - Y}{Y} \right)$$

on X_i és cada un dels valors mesurats obtinguts en el material de control, Y és el valor teòric o nominal del material de control i n és el nombre de vegades que s'ha processat el material de control i ($n = 6$ en el nostre cas).

Seguint els criteris del CLSI (8), l'EMA (9) i la FDA (20), es considera que la magnitud en estudi és estable si la diferència relativa percentual *PD* està compresa entre ± 15 %.

Abans de realitzar cap càlcul, s'ha de comprovar que no existeixi cap valor aberrant, per exemple, utilitzant la prova no paramètrica de Dixon (<http://contchart.com/outliers.aspx>).

4.11.2.3. Estudi del nombre de cicles de congelació-descongelació

Per dur a terme aquest estudi de l'estabilitat:

- 1) Preparar els materials de control i emmagatzemar-los, a temperatura de congelació (-20 °C o -80 °C), durant un període de temps mínim de 12 hores abans de la seva descongelació.

¹⁰ Veure la nota 5.

- 2) Una vegada transcorregut el període de temps d'emmagatzematge dels materials de control, després de temperar-los i agitar-los, es processen aleatòriament, en una mateixa sèrie, un mínim de sis vegades.
- 3) Per a cada material de control, calcular la diferència relativa percentual (*PD*) utilitzant la següent fórmula:

$$PD (\%) = \frac{100}{n} \cdot \sum_{i=1}^n \left(\frac{X_i - Y}{Y} \right)$$

on X_i és cada un dels valors mesurats obtinguts en el material de control, Y és el valor teòric o nominal del material de control i n és el nombre de vegades que s'ha processat el material de control i ($n = 6$ en el nostre cas).

Seguint els criteris del CLSI (8), l'EMA (9) i la FDA (20), es considera que la magnitud en estudi és estable si la diferència relativa percentual *PD* està compresa entre ± 15 %.

Abans de realitzar cap càlcul, s'ha de comprovar que no existeixi cap valor aberrant, per exemple, utilitzant la prova no paramètrica de Dixon.

- 4) Tornar a emmagatzemar els materials de control a la temperatura de congelació, durant un altre període de temps mínim de 12 hores i repetir els punts 2) i 3) d'aquest apartat.
- 5) El nombre de cicles de congelació-descongelació correspondrà al nombre de vegades en que s'ha realitzat aquest estudi de l'estabilitat i les diferències relatives percentuals obtingudes han estat compreses entre ± 15 %.

4.11.2.4. Estudi de l'estabilitat a curt termini en mostres de pacients

Per a dur a terme aquest estudi de l'estabilitat:

- 1) Decidir el període de temps i les condicions d'emmagatzematge de les mostres de pacients.
NOTA: Habitualment, al laboratori clínic, una vegada processades les mostres de pacients aquestes són emmagatzemades a una temperatura de refrigeració (2-8 °C) durant un període de temps comprés entre una setmana i un mes. En alguns laboratoris, les mostres són emmagatzemades a una temperatura de congelació (-20 °C o -80 °C) per tal de poder-les conservar durant períodes de temps més llargs (mesos o anys).
- 2) Processar, aleatòriament i en una mateixa sèrie, les diferents mostres de pacients (període de temps = t_0).
- 3) Emmagatzemar les mostres durant el període de temps i sota les condicions prèviament escollides.
- 4) Una vegada transcorregut el període de temps d'emmagatzematge de les mostres (període de temps = t_1), temperar-les i processar-les, aleatòriament i en una mateixa sèrie.
- 5) Calcular la diferència relativa percentual (*PD*) utilitzant la següent fórmula::

$$PD (\%) = \frac{100}{n} \cdot \sum_{i=1}^n \left(\frac{X_i - Y_i}{Y_i} \right)$$

on X_i és el valor mesurat obtingut en cada una de les mostres processades en el període de temps t_1 , Y_i el valor mesurat obtingut en cada un de les mostres processades en el període de temps t_0 i n és el nombre de parelles de mostres emprades en l'estudi (20, en el nostre cas).

Seguint els criteris del CLSI (8), l'EMA (9) i la FDA (20), es considera que la magnitud en estudi és estable si la diferència relativa percentual *PD* està compresa entre ± 15 %.

4.11.2.5. Estudi de l'estabilitat en el mostrejador automàtic

Per a dur a terme aquest estudi de l'estabilitat:

- 1) Decidir el període de temps i les condicions d'emmagatzematge que es volen estudiar.
- 2) Realitzar el procés d'extracció (el que es vagi a fer servir) en els materials de control i emmagatzemar els extractes durant el període de temps i sota les condicions prèviament escollides.
NOTA: Habitualment, els diferents períodes de temps en estudi solen estar compresos entre una i quaranta-vuit hores i les condicions d'emmagatzematge solen ser a temperatura ambient o a temperatura de refrigeració (2-8 °C).
- 3) Una vegada transcorregut els períodes de temps d'emmagatzematge dels extractes dels materials de control, després de temperar-los i agitar-los, es processen aleatòriament i en una mateixa sèrie un mínim de 6 vegades.
NOTA: NO s'ha de realitzar el procés d'extracció dels mateixos, és a dir, s'introdueixen directament en el sistema cromatogràfic i es processen.
- 4) Per a cada extracte del material de control, calcular la diferència relativa percentual (*PD*) utilitzant la següent fórmula:

$$PD (\%) = \frac{100}{n} \cdot \sum_{i=1}^n \left(\frac{X_i - Y}{Y} \right)$$

on X_i és cada un dels valors mesurats obtinguts en l'extracte del material de control, Y és el valor teòric o nominal de l'extracte del material de control i n és el nombre de vegades que s'ha processat l'extracte del material de control ($n = 6$ en el nostre cas).

Seguint els criteris del CLSI (8), l'EMA (9) i la FDA (20), es considera que la magnitud en estudi és estable si la diferència relativa percentual *PD* està compresa entre ± 15 %.

Abans de realitzar cap càlcul, s'ha de comprovar que no existeixi cap valor aberrant, per exemple, utilitzant la prova no paramètrica de Dixon.

A l'Annex 9, es pot trobar un exemple de com dur a terme els estudis d'estabilitat.

Els Annexos d'aquest document es poden trobar en línia a:

Annex 1: http://www.acclc.cat/continguts/mat_sup_1.pdf

Annex 2: http://www.acclc.cat/continguts/mat_sup_2.pdf

Annex 3: http://www.acclc.cat/continguts/mat_sup_3.xlsx

Annex 4: http://www.acclc.cat/continguts/mat_sup_4.xlsx

Annex 5: http://www.acclc.cat/continguts/mat_sup_5.xlsx

Annex 6: http://www.acclc.cat/continguts/mat_sup_6.xlsx

Annex 7: http://www.acclc.cat/continguts/mat_sup_7.xlsx

Annex 8: http://www.acclc.cat/continguts/mat_sup_8.xlsx

Annex 9: http://www.acclc.cat/continguts/mat_sup_9.xlsx

5. Bibliografia

- (1) International Organization for Standardization. Medical laboratories—Requirements for quality and competence. ISO 15189. Geneva: ISO; 2012.
- (2) International Union of Pure and Applied Chemistry. Compendium of chemical terminology—the Gold Book. <<http://goldbook.iupac.org/PDF/goldbook.pdf>>. (Consultat: 2014-07-31).
- (3) International Union of Pure and Applied Chemistry. Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities. *Pure Appl Chem* 1995;67:1699–723.
- (4) International Union of Pure and Applied Chemistry. Definitions of terms relating to mass spectrometry—IUPAC Recommendations 2013. *Pure Appl Chem* 2013;85:1515–609.
- (5) International Union of Pure and Applied Chemistry. Nomenclature for chromatography. *Pure Appl Chem* 1993;65:819–72.
- (6) Comissió Electrotècnica Internacional, Cooperació Internacional per a l'Accreditació de Laboratoris, Federació Internacional de Química Clínica, Oficina Internacional de Pesos i Mesures, Organització Internacional de Metrologia Legal, Organització Internacional de Normalització, Unió Internacional de Física Pura i Aplicada, Unió Internacional de Química Pura i Aplicada. Vocabulari internacional de metrologia. Conceptes fonamentals i generals i termes associats. (VIM). 3a edició. 2008. <<http://www.acclcat.cat/continguts/ivv114.pdf>>. (Consultat: 2014-07-31).
- (7) Fuentes Arderiu X. Diccionari d'especialitat: Bioquímica Clínica. Barcelona: Servei de Llengua Catalana de la Universitat de Barcelona, Edicions Universitat de Barcelona, Eumo; 1999.
- (8) Clinical and Laboratory Standards Institute, International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. Mass spectrometry in the clinical laboratory: general principles and guidance; Approved guideline. C50-A. Wayne, PA: CLSI; 2007.
- (9) European Medicines Agency. Guideline on validation of bioanalytical methods. EMEA/CHMP/EWP/192217/2009. London: EMA; 2011. <http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf>. (Consultat: 2014-07-31).
- (10) European Parliament, Council of European Union. Directive 98/79 of the European Parliament and of the Council of 27 October 1998 on in vitro diagnostic medical devices. Official Journal of European Communities 1998;(7.12.98):L331/1-L331/37. [Versió espanyola a <<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:1998L0079:20090807:es:PDF>>. (Consultat: 2014-7-31)].
- (11) European Diagnostics Manufacturers Association. Revision of Directive 98/79/EC On In Vitro Diagnostic Medical Devices. EDMA Position paper. January 2014. <http://www.edma-ivd.eu/uploads/PositionPapers/EDMA_2014-24-01_IVD_PP_FIN.pdf>. (Consultat: 2014-7-31).
- (12) European Diagnostics Manufacturers Association. Laboratory accreditation. EDMA Position paper. 2007-10-12. <http://www.edma-ivd.eu/uploads/PositionPapers/2007_10_12_ACC_Accreditation_PP_PUB.pdf>. (Consultat: 2014-7-31).
- (13) Bundesärztekammer. Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen. <http://www.bundesaerztekammer.de/downloads/Rili-BAeK-Labor_092013.pdf>. (Consultat: 2014-07-31).
- (14) Center for Disease Control and Prevention. Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988. <<http://www.cdc.gov/clia/Regulatory/default.aspx>>. (Consultat: 2014-07-31).
- (15) Associació Catalana de Ciències de Laboratori Clínic. Requisits metroloògics en les ciències de laboratori clínic. *In vitro veritas* 2014;15:17–31.
- (16) Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular. Recomendaciones para el uso de las especificaciones de la Calidad Analítica. <http://www.seqc.es/es/Publicaciones/2/16/Comision_de_Calidad_Analitica_-_Documentos_definitivos/>. (Consultat: 2014-07-31).
- (17) Ricós C, Ramón C, Salas A, Buño A, Calafell R, Morancho J, et al. Minimum analytical quality specifications of inter-laboratory comparisons: agreement among Spanish EQAP organizers. *Clin Chem Lab Med* 2012;50(3):455–61.
- (18) Commission Suisse pour l'Assurance Qualité dans le Laboratoire. Contrôle de qualité externe obligatoire. <http://www.qualab.ch/index_fr.php?TPL=10063>. (Consultat: 2014-07-31).
- (19) Clinical and Laboratory Standard Institute. Preliminary evaluation of quantitative clinical laboratory measurement; Approved guideline—Third edition. EP10-A3-AMD. Wayne, PA: CLSI; 2014.
- (20) United States Food and Drug Administration. Guidance for Industry—Bioanalytical method validation (Draft Guidance). Rockville: FDA, 2013. <<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM368107.pdf>>. (Consultat: 2014-07-31).
- (21) Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular. Validación analítica de los procedimientos de medida del laboratorio clínico. Documentos de la SEQC 2013:70–75.
- (22) Clinical and Laboratory Standard Institute. Preliminary evaluation of quantitative clinical laboratory measurement; Approved guideline—Third edition. EP10-A3-AMD. Wayne, PA: CLSI; 2014.
- (23) International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Validation of analytical procedures: text and methodologies. Q2(R1). Geneva: ICH, 2005. <http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf>. (Consultat: 2014-07-31).
- (24) Laboratory of the Government Chemist. In-House Method Validation: A Guide for Chemical Laboratories. Teddington: LGC; 2003.
- (25) International Union of Pure and Applied Chemistry. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. *Pure Appl Chem* 2002;74:835–55.
- (26) Clinical and Laboratory Standard Institute. A framework for NCCLC evaluation protocols; A report. EP19-R. Wayne, PA: CLSI; 2002.
- (27) Eurachem. The fitness for purpose of analytical methods—A laboratory guide to method validation and related topics. Salzburg: Eurachem, 1998. <<http://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/valid.pdf>>. (Consultat: 2014-07-31).
- (28) International Union of Pure and Applied Chemistry. Guidelines for calibration in analytical chemistry. Part I. Fundamentals and single component calibration. *Pure Appl Chem* 1998;70:993–1014.
- (29) International Union of Pure and Applied Chemistry. Guidelines for calibration in analytical chemistry. Part 2: Multispecies Calibration. *Pure Appl Chem* 2004;76:1215–26.
- (30) Skoog DA, Holler FJ, Nieman TA. Principios de análisis instrumental. Madrid: McGraw-Hill Interamericana de España; 2001.
- (31) Sánchez Palacios MA. Métodos de calibrado. <http://webdelprofesor.ula.ve/ciencias/angelisa/Downloads/tecnicasc_alibracio_vr1.pdf>. (Consultat: 2014-07-31).
- (32) Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular. Procedimiento recomendado para el estudio de la linealidad de los procedimientos de medida en el laboratorio clínico. Documentos de la SEQC 2011:1–5.
- (33) Clinical and Laboratory Standard Institute. Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures: a statistical approach; Approved guideline. EP6-A. Wayne, PA: CLSI; 2003.
- (34) International Organization for Standardization. Linear calibration using reference materials. ISO 11095. Geneva: ISO; 1996.
- (35) Clinical and Laboratory Standard Institute. Evaluation of detection capability for clinical laboratory measurements procedures; Approved guideline—Second edition. EP17-A2. Wayne, PA: CLSI; 2012.
- (36) Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular. Recomendaciones para el estudio de la capacidad de detección de los procedimientos de medida. *Quim Clin* 2004;439–41.
- (37) International Organization for Standardization. Capability of detection—Part 1: Terms and definitions. ISO 11843-1/Cor. 1:2003. Geneva: ISO; 1997.

- (38) International Organization for Standardization. Capability of detection— Part 2: Methodology in the linear calibration case. ISO 11843-2/Cor. 1:2007. Geneva: ISO; 2000.
- (39) International Organization for Standardization. Capability of detection— Part 3: Methodology for determination of the critical value for the response variable when no calibration data are used. ISO 11843-3. Geneva: ISO; 2003.
- (40) International Organization for Standardization. Capability of detection— Part 4: Methodology for comparing the minimum detectable value with a given value. ISO 11843-4. Geneva: ISO; 2003.
- (41) International Organization for Standardization. Capability of detection— Part 5: Methodology in the linear and non-linear calibration cases. ISO 11843-5. Geneva: ISO; 2008.
- (42) International Organization for Standardization. Capability of detection— Part 6: Methodology for the determination of the critical value and the minimum detectable value in Poisson distributed measurements by normal approximations. ISO 11843-6. Geneva: ISO; 2013.
- (43) International Organization for Standardization. Capability of detection— Part 7: Methodology based on stochastic properties of instrumental noise. ISO 11843-7. Geneva: ISO; 2012.
- (44) Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular. Estudio de la precisión de los procedimientos de medida en el laboratorio clínico. Documentos de la SEQC 2014: Pendient de publicació.<http://www.seqc.es/es/Publicaciones/3/20/Comision_de_Metrologia_y_Sistemas_Analiticos_-_Documentos_nuevos/>. (Consultat: 2014-07-31).
- (45) Clinical and Laboratory Standard Institute. User verification of performance for precision and trueness; Approved guideline — Second edition. EP15-A2. Wayne, PA: CLSI; 2006.
- (46) Clinical and Laboratory Standard Institute. Evaluation of precision performance of quantitative measurement methods; Approved guideline — Second edition. EP5-A2. Wayne, PA: CLSI; 2004.
- (47) International Organization for Standardization. Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results— Part 1: General principles and definitions. ISO 5725-1/Cor. 1:1998. Geneva: ISO; 1994.
- (48) International Organization for Standardization. Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results— Part 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method. ISO 5725-2/Cor. 1:2002. Geneva: ISO; 1994.
- (49) International Organization for Standardization. Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results— Part 3: Intermediate measures of the precision of a standard measurement method. ISO 5725-3/Cor. 1:2001. Geneva: ISO; 1994.
- (50) International Organization for Standardization. Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results— Part 5: Alternative methods for the determination of the precision of a standard measurement method. ISO 5725-5/Cor.1:2005. Geneva: ISO; 1994.
- (51) International Organization for Standardization. Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results— Part 6: Use in practice of accuracy values. ISO 5725-6/Cor. 1:2001. Geneva: ISO; 1994.
- (52) Clinical and Laboratory Standard Institute. Measurement procedure comparison and bias estimation using patient samples; Approved guideline— Third edition. EP09-A3. Wayne, PA: CLSI; 2013.
- (53) Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular. Recomendaciones para el estudio de la veracidad de los procedimientos de medida en el laboratorio clínico mediante la utilización de materiales de referencia. Documentos de la SEQC 2010:1–6.
- (54) Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular. Recomendaciones para el estudio de la veracidad en el laboratorio clínico mediante la comparación de procedimientos de medida. Documentos de la SEQC 2010:7–13.
- (55) International Organization for Standardization. Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results— Part 4: Basic methods for the determination of the trueness of a standard measurement method. ISO 5725-4. Geneva: ISO; 1994.
- (56) Hemolysis, icterus and lipemia/turbidity indices as indicators of interference in clinical laboratory analysis; Approved guideline. C56-A. Wayne, PA: CLSI; 2012.
- (57) Clinical and Laboratory Standard Institute. Interference testing in clinical chemistry; Approved guideline — Second edition. EP7-A2. Wayne, PA: CLSI; 2005.
- (58) International Union of Pure and Applied Chemistry. Selectivity in analytical chemistry. *Pure Appl Chem* 2001;73:1381–6.
- (59) Galimany R, Antoja E, Gascón N. Interferencias analíticas en Química Clínica. Barcelona: Sociedad Española de Química Clínica; 1993.
- (60) Sociedad Española de Bioquímica y Patología Molecular. Estudio de las interferencias endógenas en química clínica. *Quim Clin* 1994;13:84–92.
- (61) International Union of Pure and Applied Chemistry. Definition and classification of interferences in analytical procedures. *Pure Appl Chem* 1989;61:91–5.
- (62) International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. Guidelines to the evaluation of drug effects in clinical chemistry. *Scand J Clin Lab Invest* 1989;49:1–29.
- (63) International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. Drugs effects in clinical chemistry. Part 1: The basic concepts. *J Clin Chem Clin Biochem* 1984;22:271–74.
- (64) International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. Drugs effects in clinical chemistry. Part 2: Guidelines for evaluation of analytical interference. *J Clin Chem Clin Biochem* 1984;22:275–79.
- (65) International Union of Pure and Applied Chemistry. Proposals for the description and measurement of carry-over effects in clinical chemistry. *Pure Appl Chem* 1991;63:301–6.
- (66) International Union of Pure and Applied Chemistry. Use of the term "recovery" and "apparent recovery" in analytical procedures. *Pure Appl Chem* 2002;74:2201–5.
- (67) International Union of Pure and Applied Chemistry. Harmonized guidelines for the use of recovery information in analytical measurement. *Pure Appl Chem* 1999;71:337–48.
- (68) Clinical and Laboratory Standard Institute. Evaluation of matrix effects; Approved guideline — Second edition. EP14-A2. Wayne, PA: CLSI; 2005.
- (69) Van Eeckhaut A, Lanckmans K, Sarre S, Smolders I, Michotte Y. Validation of bioanalytical LC–MS/MS assays: Evaluation of matrix effects. *J Chromatogr B* 2009;877:2198–207.
- (70) Viswanathan CT, Bansal S, Booth B, DeStefano AJ, Rose MJ, Sailstad J *et al.* Quantitative bioanalytical methods validation and implementation: best practices for chromatographic and ligand binding assays. *Pharm Res* 2007;24:1962–73.
- (71) Taylor PJ. Matrix effects: The Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography–electrospray–tandem mass spectrometry. *Clin Biochem* 2005;38:328–34.
- (72) Matuszewski BK, Constanzer ML, Chavez-Eng CM. Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. *Anal Chem* 2003;75:3019–30.
- (73) Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular. Recomendaciones para el estudio de la veracidad en el laboratorio clínico mediante participación en programas de evaluación externa. Documentos de la SEQC 2010:<http://www.seqc.es/es/Publicaciones/2/12/Comision_de_Metrologia_y_Sistemas_Analiticos_-_Documentos_definitivos/>. (Consultat: 2014-07-31).
- (74) Clinical and Laboratory Standard Institute. Using proficiency testing to improve the clinical laboratory; Approved guideline — Second edition. GP27-A2. Wayne, PA: CLSI; 2007.
- (75) International Union of Pure and Applied Chemistry. The international harmonized protocol for the proficiency testing of analytical chemistry laboratories. *Pure Appl Chem* 2006;78:145–96.
- (76) International Organization for Standardization. Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparisons. ISO 13528. Geneva: ISO; 2005.
- (77) Clinical and Laboratory Standard Institute. Estimation of total analytical error for clinical laboratory methods; Approved guideline. EP21-A. Wayne, PA: CLSI; 2003.

- (78) Clinical and Laboratory Standard Institute. Assessment of laboratory tests when proficiency testing is not available; Approved guideline — Second edition. GP29-A2. Wayne, PA: CLSI; 2008.
- (79) Associació Catalana de Ciències de Laboratori Clínic. Guia per a la interpretació dels valors mesurats de control dels programes d'avaluació externa de la qualitat per a les magnituds biològiques. *In vitro veritas* 2011;12:4–14.
- (80) International Bureau of Weights and Measures, International Electrotechnical Commission, International Federation of Clinical Chemistry, International Laboratory Accreditation Cooperation, International Organization for Standardization, International Union of Pure and Applied Chemistry, International Union of Pure and Applied Physics, International Organization of Legal Metrology. Evaluation of measurement data — Guide to the expression of uncertainty in measurement. Geneva: ISO; 2008.
- (81) Fuentes Arderiu X. Guia per estimar la incertesa de mesura. *In vitro veritas* 2001;2:<<http://www.acclc.cat/continguts/ivv033.pdf>>. (Consultat: 2014-07-31).
- (82) International Organization for Standardization. In vitro diagnostic medical devices — Evaluation of stability of in vitro diagnostic. ISO 23640. Geneva: ISO; 2011.
- (83) Clinical and Laboratory Standard Institute. Evaluation of stability of *in vitro* diagnostics reagents; Approved guideline. EP25-A. Wayne, PA: CLSI; 2009.
- (84) Boletín informativo de la Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular 2009;165:7 <http://www.seqc.es/es/Publicaciones/1003/4/Boletin_Informativo_165/>. (Consultat: 2014-07-31).
- (85) Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular. Definición del límite de estabilidad de las magnitudes en las muestras biológicas. *Quim Clin* 2006;25:81–5.
- (86) Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular. Protocolo para el estudio de la estabilidad de las magnitudes biológicas. *Quim Clin* 2006;25:86–9.
- (87) Cruz Carlos LM, Monge Azemar N, Valero Politi J, Fuentes Arderiu X. Estabilitat de les magnituds bioquímiques. *In vitro veritas* 2002;3:< <http://www.acclc.cat/continguts/ivv035.pdf>>. (Consultat: 2014-07-31).
- (88) Rigo Bonnin R. L'espectrometria de masses com a principi de mesura: fonaments i aplicació en les ciències de laboratori clínic. *In vitro veritas* 2013;14:161–83.
- (89) Rigo Bonnin R. La cromatografia com a principi de mesura: classificació, fonaments teòrics i aplicació en les ciències de laboratori clínic. *In vitro veritas* 2013;14:80–103.