1 OBJETIVO

Fornecer orientações para a validação dos métodos de análises cromatográficas quantitativas.

2 CAMPO DE APLICAÇÃO

Este procedimento se aplica a todos os métodos para análises cromatográficas quantitativas utilizados no SEPLAB.

3 DOCUMENTOS RELACIONADOS

- FOR-D-SGQ-11.1 Plano de validação de método instrumental;
- FOR-D-SGQ-11.2 Relatório de validação de método instrumental.

4 RESPONSABILIDADES

Função	**Responsabilidades**
Perito	Realizar exames periciais; Emitir laudos periciais, informações e outros documentos técnicos.
Gerente Técnico	Participar da seleção de métodos e autorizar o uso de procedimentos técnicos em sua respectiva área; Estabelecer critérios para verificação e validação de metodologias analíticas e de exame; Coordenar a revisão e atualização das metodologias analíticas e de exame.
Técnico	Auxiliar no desenvolvimento e na validação de métodos para realização de exames periciais.

5 REFERÊNCIAS

- ANVISA - Resolução RE nº 899 de 29 de maio de 2003 – Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos;
- Bell, S. Forensic Chemistry, 2nd Ed. Pearson, 2013;
- Diretriz ILAC G19;
- ICH - International Conference on Harmonisation, Q2(R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, 1996;
- INMETRO - Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos – DOQ-CGCRE-008, Coordenação Geral de Acreditação – Revisão 09 – Jun/2020.
- Item 7.2.2 da ISO/IEC 17025;
- Manual da Qualidade do Sistema Nacional de Criminalística;
- Swartz, M. E.; Krull, I. S. Handbook of Analytical Validation, CRC Press, 2012;
- SWGDRUG; SD-4 Measurement Uncertainty for Purity Determinations in Seized Drug Analysis, 2013;
- UNODC - Guidance for the Validation of Analytical Methodology and Calibration of Equipment used for Testing of Illicit Drugs in Seized Materials and Biological Specimens, 2009;
- Validating Chromatographic Methods, A Practical Guide, David M. Bliesner; 2006; John Wiley and Sons, Inc.

6 DEFINIÇÕES, SIGLAS E ABREVIATURAS

6.1. Definições

- Especificidade – o método mede exclusivamente o analito sem interferência de nenhum outro composto;
- Estabilidade - Capacidade do analito de permanecer inalterado durante o tempo e condições de análise;
- Exatidão - Grau de concordância entre o valor medido e o valor verdadeiro;
- Faixa de trabalho - Intervalo no qual o método é preciso, exato e linear;

- Limite de Detecção (LD) - Menor quantidade detectável, mas não quantificável, com confiança;
- Limite de Quantificação (LQ) - Menor quantidade que pode ser quantificada com exatidão e precisão;
- Linearidade - Capacidade de gerar resultados proporcionais à concentração do analito;
- Precisão - Grau de concordância entre resultados sucessivos;
- Precisão intermediária - Mede a variação dentro do mesmo laboratório, considerando dias diferentes, analistas diferentes ou equipamentos distintos;
- Reprodutibilidade - grau de concordância entre resultados obtidos por laboratórios diferentes, sob condições variadas;
- Robustez - Capacidade do método de resistir a pequenas variações;
- Seletividade - Capacidade de diferenciar o analito na presença de interferentes.

6.2. Siglas e abreviaturas

- CV - Coeficientes de Variação;
- DEA - Drug Enforcement Administration;
- RSD - Desvio Padrão Relativo;
- SWGDRUG - Scientific Working Group for the Analysis of Seized Drug;
- UNODC - Escritório das Nações Unidas sobre Drogas e Crime.

7 RECURSOS NECESSÁRIOS

- Balão volumétrico;
- Cromatógrafo Gasoso acoplado a Detector por Ionização de Chama (CG/FID);
- Cromatógrafo Gasoso acoplado ao Espectrômetro de Massas (CG/EM);
- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência com Detecção por Ultravioleta (CLAE/DAD);
- Materiais de Referência (Padrões);
- Pipeta automática.

8 DESCRIÇÃO

8.1. Regras Gerais

Os parâmetros discutidos neste POP têm por objetivo orientar a validação de métodos analíticos cromatográficos quantitativos, de modo a assegurar a obtenção de dados precisos, exatos e confiáveis.

Os critérios de aceitação propostos devem servir como referência no processo de desenvolvimento, avaliação, validação e documentação do método. A adoção de critérios de aceitação mais amplos deve ser justificada e deve se mostrar adequada aos propósitos do método analítico.

Os equipamentos a serem utilizados durante as validações devem ser avaliados para comprovar que se encontram adequados ao uso, com as verificações de desempenho e manutenções de rotina em dia.

8.2. Registros da Validação

Deve ser realizado um plano de estudo, utilizando para registro o FOR-D-SGQ-11.1 Plano de validação de método instrumental, incluindo as seguintes informações:

- Nome da metodologia a ser avaliada;
- Objetivos a serem atingidos;
- Parâmetros a serem avaliados;
- Planejamento das ações e/ou experimentos a serem desenvolvidos.

Devem ser registradas as seguintes informações e dados nos relatórios de validações, utilizando para registro o FOR-D-SGQ-11.2 Relatório de validação de método instrumental, incluindo as seguintes informações:

- Metodologias para construção de curvas analíticas e estabelecimento das figuras de mérito;
- Metodologias de preparação das soluções padrão e soluções teste;
- Parâmetros de aceitação adotados;

- Equipamentos e padrões utilizados;
- Cromatogramas e espectros obtidos;
- Resultados obtidos.

As validações realizadas no SEPLAB são feitas nas condições ambientais do laboratório. Nos casos de necessidades específicas de condições ambientais especiais, estas devem ser estabelecidas no planejamento e estarem registradas no relatório de validação.

8.3. Parâmetros da validação

Estabilidade;

Exatidão;

Faixa de trabalho e linearidade;

Limite de detecção (LD);

Limite de quantificação (LQ);

Precisão: repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade;

Robustez;

Seletividade e especificidade.

8.4. Seletividade e especificidade

A seletividade é a habilidade de um método em separar todos os componentes de uma amostra. A especificidade está relacionada com a habilidade de avaliar inequivocamente um analito de interesse na presença de outras substâncias.

Para avaliar a seletividade e a especificidade, preparar e analisar no mínimo duas soluções, em seis replicatas, de misturas contendo cada um dos analitos de interesse. Caso seja adequado, incluir padrão interno, adulterantes, contaminantes, impurezas, produtos de degradação, substâncias com estrutura similar e outros compostos esperados, em concentrações próximas das concentrações presentes em amostras reais.

Em amostras reais as matrizes podem sofrer variações imprevisíveis, relacionadas com modos de produção, diluição e adulteração dinâmicos. Um levantamento do histórico dos principais componentes encontrados em amostras reais pode ser utilizado para orientar os estudos de seletividade.

8.4.1. Critérios de aceitação:

Para técnicas que não utilizem detectores de massas (e.g. CG/FID), os analitos de interesse devem ser separados na linha de base cromatográfica. Se necessário, a resolução (R) entre os componentes testados pode ser calculada e deve ser maior que 1,5.

$$R = \frac{[2(t_2 - t_1)]}{w_2 + w_1}, \text{ onde}$$

t_2 e t_1 = tempo de retenção dos componentes

w_2 e w_1 = largura da base dos sinais dos componentes

Para técnicas que utilizam detecção por massas (e.g. CG/EM, CLAE/EM, etc.), a separação na linha de base é desejável, mas não necessária.

Confirmar que não existem interferentes nas zonas de eluição dos analitos a serem quantificados, oriundos dos “brancos” de solventes, do padrão interno ou da matriz.

Confirmar que impurezas ou produtos de degradação não eluem nas zonas de eluição dos analitos a serem quantificados.

Limitações do método, como coeluição de analitos ou a necessidade do uso de um solvente específico, devem ser documentadas.

8.5. Faixa de trabalho e linearidade

Nos métodos quantitativos deve ser demonstrada qual é a faixa de concentrações do analito na qual o método pode ser aplicado.

A faixa de trabalho deve cobrir a faixa de aplicação para a qual o ensaio vai ser usado e a concentração mais esperada da amostra deve, sempre que adequado, se situar no centro da faixa de trabalho.

Dentro da faixa de trabalho pode existir uma faixa de resposta linear na qual o sinal analítico terá uma relação linear com a concentração (quantidade) do analito na amostra.

Materiais de referência (padrões) devem ser utilizados para construção da curva analítica e avaliação de faixa de trabalho e linearidade.

8.5.1. Metodologia

Preparar as soluções da curva analítica com materiais de referência (padrões) em um solvente selecionado. O número mínimo de níveis de concentração para uma curva analítica deve ser de 5 (cinco) e a concentração das soluções nos níveis deve espelhar a faixa de concentração a ser quantificada nas amostras reais.

As soluções nas concentrações selecionadas para cada nível podem ser preparadas por diluição de soluções estoque contendo os analitos a serem quantificados. As diluições devem ser realizadas em triplicata para cada nível de concentração.

Preparações gravimétricas para cada nível também são possíveis, mas geralmente consomem maior quantidade dos padrões.

Resultados das médias das respostas dos analitos (e.g. área) devem ser representados em gráficos relacionados com a concentração das soluções preparadas e analisadas. No caso de uso de um padrão interno, as razões de resposta analítica e de concentração para os analitos deverão considerar os valores obtidos para o padrão interno.

8.5.2. Critérios de aceitação

Deverão ser observados para cada analito de interesse, individualmente:

- O coeficiente de correlação (r^2) deve ser acima de 0,998;
- As concentrações para cada replicada obtida a partir das curvas experimentais devem ser avaliadas de acordo com o considerado adequado para o método (e.g. erros máximos de até 5% em relação às concentrações teóricas);
- Os valores de Desvio Padrão Relativo (RSD) ou Coeficientes de Variação (CV) das replicatas de cada ponto/concentração da curva deve ser menor que 5%.

- Análise de resíduos: a distribuição dos resíduos no gráfico deve ser aleatória, não apresentando curvaturas ou tendências.

8.6. Limite de detecção (LD)

É a menor concentração de um analito que pode ser detectada em uma amostra.

8.6.1. Metodologia

Pode ser determinado por abordagens diversas, baseadas em exames visuais, na análise da relação sinal/ruído ou pelo cálculo do desvio padrão da resposta e inclinação de curvas analíticas.

Relação sinal/ruído: a variação do sinal aleatório de uma região sem a presença de analitos fornece o valor do "ruído" do método; na comparação com sinal do analito em baixas concentrações, uma razão sinal/ruído entre 3:1 é considerada aceitável como sendo uma estimativa do limite de detecção.

Cálculos do LD feitos com base no desvio padrão da resposta e inclinação de curvas analíticas na região próxima do LD também são rotineiramente empregados.

$LD = 3 (S_{y/x}/m)$, onde

$S_{y/x}$ = desvio padrão do intercepto com o eixo do y de, ao menos, 3 curvas analíticas contendo concentrações do analito próximas ao suposto LD

m = inclinação da curva analítica

Critério de aceitação: O LD deve ser suficientemente baixo para que se detecte o analito em concentrações mínimas e que sejam típicas das amostras reais a serem analisadas pelo método. O sinal deve ser reprodutível para que a substância em análise seja detectada com confiança.

8.7. Limite de Quantificação (LQ)

É a menor concentração de um analito que pode ser quantificada levando-se em conta os parâmetros de precisão e exatidão considerados aceitáveis.

8.7.1. Metodologia

Pode ser determinado por abordagens semelhantes ao LD, baseadas na análise da relação sinal/ruído ou pelo cálculo do desvio padrão da resposta e inclinação de curvas analíticas.

Relação sinal/ruído: a variação do sinal aleatório de uma região sem a presença de analitos (branco) fornece o valor do "ruído" do método; na comparação com o sinal do analito em baixas concentrações, uma razão sinal/ruído 10:1 é considerada aceitável como sendo uma estimativa do limite de quantificação.

Cálculos do LQ feitos com base no desvio padrão da resposta e inclinação de curvas analíticas na região próxima do LQ também são rotineiramente empregados.

$LQ = 10 (S_{y/x}/m)$, onde

$S_{y/x}$ = desvio padrão do intercepto com o eixo do y de, ao menos, 3 curvas analíticas contendo concentrações do analito próximas ao suposto LQ.

m = inclinação da curva analítica.

Critério de aceitação: para LQ determinados experimentalmente pela relação sinal/ruído, os coeficientes de variação (CV %) dos teores deve ser inferior a 10%.

8.8. Precisão

A precisão de um método analítico é a medida da proximidade dos resultados analíticos obtidos por uma série de experimentos, em replicatas de uma mesma medida. É comumente avaliada por 3 diferentes níveis: repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade. Para análises em um único laboratório, recomenda-se que sejam avaliados no mínimo os parâmetros repetitividade e precisão intermediária, conforme descrito abaixo.

8.8.1. Repetitividade

É avaliada quando o mesmo analista processa as amostras no método analítico em repetições sucessivas em um único dia, em um único instrumento (e.g CG/FID) e em um mesmo laboratório.

As soluções para análise devem ser preparadas de forma a cobrirem as faixas de trabalho típicas: nos níveis alto, médio e baixo, coerentes com as concentrações encontradas em amostras reais. Sugere-se preparar e analisar 6 amostras para cada nível e calcular o desvio padrão.

Critério de aceitação: o Coeficiente de Variação (CV) deve ser menor que 10% para cada nível avaliado.

A verificação da repetitividade do equipamento analítico utilizado (e.g. CG/FID) deve ser feita antes das demais etapas da validação por meio da análise de 6 replicatas de somente um dos frascos das soluções preparadas para cada nível (e.g. 6 replicatas de um frasco do nível alto, 6 do nível médio e 6 do nível baixo). O critério de aceitação é que o Coeficiente de Variação (CV) seja menor que 5% para cada nível avaliado.

Caso não se constate degradações, alíquotas das soluções (nível baixo, médio e alto) podem ser armazenadas para realização dos ensaios de robustez e estabilidade.

8.8.2. Precisão intermediária

Se refere à concordância dos resultados em um laboratório considerando eventos aleatórios que podem ocorrer pelo uso rotineiro de um método analítico, como análises em dias diferentes, por mais de um analista e pelo uso de equipamentos diferentes.

Pode ser avaliada utilizando alíquotas das soluções preparadas para teste de repetitividade.

8.8.3. Metodologia

Em outro equipamento cromatográfico, o mesmo analista deve repetir as análises de repetitividade (6 replicatas para frascos do nível alto, 6 do nível médio e 6 do nível baixo).

O mesmo analista, no mesmo equipamento, deve repetir as análises de repetitividade (6 replicatas para frascos do no nível alto, 6 do nível médio e 6 do nível baixo) por dois dias seguidos ou intercalados, no prazo de 7 dias.

Um segundo analista capacitado deve repetir as análises de repetitividade (6 replicatas para frascos do no nível alto, 6 do nível médio e 6 do nível baixo) em um dia diferente e não coincidente com outras avaliações de precisão intermediária.

Critério de aceitação: os valores de Coeficiente de Variação (CV) devem ser menores que 10% nas concentrações avaliadas.

8.9. Exatidão

A exatidão de um método analítico é uma medida da proximidade de um resultado encontrado pela análise de uma amostra em comparação com um valor de referência conhecido.

Medidas de exatidão são normalmente obtidas por comparação dos resultados da análise de materiais de referência (padrões), estudos colaborativos ou por comparação com outros métodos validados.

As diferenças obtidas são normalmente atribuídas a erros sistemáticos do método ou do laboratório.

8.9.1. Metodologia

Devem ser preparadas misturas contendo quantidades conhecidas dos componentes ou impurezas a serem quantificados em teores que cubram as faixas de trabalho típicas para cada analito nos níveis alto, médio e baixo, coerentes com as concentrações encontradas em amostras reais.

É recomendado que não sejam preparadas misturas com as mesmas concentrações das curvas analíticas e que não se utilize soluções estoque anteriores para a avaliação da exatidão.

Deve-se preparar e analisar pelo menos 3 soluções padrão para cada nível alto/médio/baixo.

Calcular a recuperação (em porcentagem) da quantidade conhecida do analito adicionado.

Critério de aceitação: os valores para os teores das replicatas em cada nível de concentração deve apresentar erros máximos de 10% quando comparados com teores esperados (calculados). Exemplo: Exatidão entre 90%-110% do teor esperado, no nível de 100%.

Alíquotas das soluções (nível baixo, médio e alto) podem ser armazenadas para realização dos ensaios de robustez e estabilidade.

8.10. Robustez

A robustez de um procedimento analítico é representada por sua capacidade de não ser afetado por pequenas variações em parâmetros do método deliberadamente realizadas e que poderiam ocorrer durante a execução do método em rotina.

8.10.1. Metodologia

Para os ensaios de robustez podem ser aproveitadas as soluções preparadas para os ensaios de repetitividade ou precisão, quando adequadamente preservadas.

Para avaliar a robustez da metodologia pode ser utilizada a abordagem de Youden, em que são realizadas, por exemplo, variações controladas em 7 parâmetros críticos para cromatografia, através de um planejamento fatorial que resultará em 8 ensaios. Os parâmetros devem ser alterados em relação aos parâmetros originais do método analítico proposto.

Devem ser avaliadas 3 soluções no nível médio para cada ensaio.

8.10.2. Variações típicas em parâmetros para estudos de robustez:

- CLAE: Volume de injeção (± 10%), pH de tampão (± 0,2 unidades pH), composição de fase móvel (± 10%, absoluto), vazão da fase móvel (± 25%) e temperatura da coluna (± 5%).
- CG: Razão de *Split* (± 10%), temperatura do injetor (± 5ºC), fluxo do gás carregador (± 10%), volume de injeção em métodos com uso de padrão interno (± 10%), uso de diferentes fornecedores de coluna cromatográfica ou de gases.

8.10.3. Critérios de aceitação

Avaliar a resolução cromatográfica (Rs) dos picos dos analitos em comparação com a resolução dos picos no método original sem variações. Após as variações, a resolução dos picos não deve ser maior do que 2,0.

Se forem realizadas replicatas, o coeficiente de Variação (CV) para cada analito e ensaio deve ser menor que 10%.

A medida de pureza do analito obtida após variação dos parâmetros não pode ter diferença superior a 10% em relação àquela obtida no método original.

Cálculo da percentagem da diferença:

$$\%\ diferença = 100 \cdot \frac{Rm}{Rs}$$

Onde:

Rm = resultado com variação

Rs = resultado original

8.11. Estabilidade

Durante a validação, a estabilidade de soluções de padrões e amostras é estabelecida mantendo as mesmas em condições normais na bancada, geladeira, algumas vezes no amostrador do instrumento, para determinar se é necessária alguma condição especial de armazenamento, como refrigeração ou proteção da luz.

Para avaliar o uso de soluções preparadas com antecedência em estudos quantitativos é necessário verificar se não há degradação dos analitos nas condições de estocagem.

A estabilidade é fundamental para o uso de soluções preparadas na avaliação da repetitividade ou da precisão em futuros ensaios de robustez, por exemplo. De forma análoga, é importante avaliar se amostras preparadas em uma oportunidade poderão ser analisadas posteriormente com confiança e, caso seja possível, quais são as condições de estocagem.

A estabilidade pode ser determinada pela comparação da resposta do perfil de impurezas de padrões ou amostras preparadas anteriormente com a resposta do perfil de impurezas de amostras ou padrões recém-preparados.

8.11.1. Metodologia

Soluções preparadas na avaliação da repetitividade ou precisão (nos 3 níveis de concentração) devem ser analisadas, em duplicada, após períodos de tempo considerados adequados aos propósitos do método (e.g. após 24 horas, 48 horas, 72 horas, 7 dias, 30 dias, 90 dias, etc). Intervalos mais amplos podem ser estudados, desde que sejam adequados ao método.

As condições de estocagem devem levar em conta os propósitos do método e comparações de diferentes condições de estocagem podem ser realizadas [e.g. estocagem das soluções à temperatura ambiente (20ºC) e em freezer (-10ºC)].

Pode-se avaliar a estabilidade das soluções por meio do cálculo do erro relativo [ER = (concentração real-concentração obtida)/concentração real], expresso em percentagem.

Critérios de Aceitação: A medida de pureza do analito obtida após período avaliado não pode ter diferença superior a 5% em relação àquela obtida no método original.

8.12. Estimativa da Incerteza da Medição

A estimativa da incerteza da medição fornece parâmetros para afirmar que os resultados e conclusões obtidos pelo método estão sendo adequados ao propósito esperado e dentro de um determinado nível de confiança.

A incerteza abrange, normalmente, uma série de componentes que podem ter suas contribuições individuais estimadas e consideradas para a obtenção da incerteza total do método. Vários estágios do processo de análise envolvidos na obtenção do resultado final podem ser considerados na estimativa da incerteza da medição, como pesagens, pipetagens, extrações, derivatizações e demais passos da validação.

8.12.1. Metodologia

As abordagens para obtenção das estimativas de incerteza de medição são muitas e normalmente dedicadas a atender demandas específicas do contexto de execução do método desenvolvido. Nesse contexto, guias aplicados às demandas forenses (e.g. SWGDRUG ou UNODC) consideram experiências práticas e discussões típicas da área e podem ser utilizados como uma referência.

Uma abordagem prática (SWGDRUG-SD4) utiliza cartas-controle como forma de avaliar incertezas inerentes ao uso rotineiro de uma metodologia analítica (englobando diferentes analistas, variação temporal, mudanças de amostras controle, manutenções de equipamentos, calibrações, etc) e utiliza os CV% no somatório dos componentes individuais de incerteza. São somadas ainda componentes de incerteza do padrão analítico utilizado na construção das curvas analíticas e da repetitividade obtida na validação do método.

8.12.2. Critérios de Aceitação

Os valores de incerteza obtidos devem ser adequados ao propósito e nível de confiança esperado do método avaliado.

Como referência, quantificações de componentes majoritários por CG/FID em programas estabelecidos de perfil químico de drogas (e.g. DEA/EUA, LPS/França) apresentam valores de incerteza para purezas na faixa de 3-5% (relativo) e 95% de intervalo de confiança (k=2).

9 HISTÓRICO DE REVISÕES

Versão	Data	Descrição
0	06/08/2014	Emissão Inicial
0	26/09/2016	Revalidação sem alterações
1	19/10/2018	Atualização do item da ISO 17025 na seção de referências. Inclusão do item 5.2.1 com a exigência de elaboração de um plano de estudo e inclusão dos códigos dos formulários para elaboração do plano e do relatório de validação (itens 5.2.1 e 5.2.2).
2	08/09/2025	Adequação ao novo modelo da SGQ. Inclusão dos Formulários FOR-D-SGQ-11.1 Plano de validação de método instrumental e FOR-D-SGQ-11.2 Relatório de validação de método instrumental na seção 3. Atualização da revisão do DOQ-CGCRE-008 na seção 5. Adição de parágrafo à seção 8.7.1 informando o critério de aceitação: para LQ determinados experimentalmente pela relação sinal/ruído, os coeficientes de variação (CV %) dos teores deve ser inferior a 10%.