
NORMA CUBANA

Especificación Técnica

NC

TS 368: 2010

**GUÍA PARA LA VALIDACIÓN DE MÉTODOS DE ENSAYOS
QUÍMICOS PARA ALIMENTOS**

Guidelines for Validation of Chemical Testing Methods for Foods

ICS: 67.020

**1. Edición Mayo 2010
REPRODUCCIÓN PROHIBIDA**

Oficina Nacional de Normalización (NC) Calle E No. 261 Vedado, Ciudad de La Habana. Cuba. Teléfono: 830-0835 Fax: (537) 836-8048; Correo electrónico: nc@ncnorma.cu; Sitio Web: www.nc.cubaindustria.cu



Cuban National Bureau of Standards

NC-TS 368: 2010

Prefacio

La Oficina Nacional de Normalización (NC), es el Organismo Nacional de Normalización de la República de Cuba y representa al país ante las organizaciones internacionales y regionales de normalización.

La elaboración de las Normas Cubanas y otros documentos normativos relacionados se realiza generalmente a través de los Comités Técnicos de Normalización. Su aprobación es competencia de la Oficina Nacional de Normalización y se basa en las evidencias del consenso.

Esta Especificación Técnica:

- Ha sido elaborada por el Comité Técnico de Normalización NC/CTN 46 de Métodos de Análisis y Toma de Muestras, en el que están representadas las siguientes entidades:
 - Instituto de Nutrición e Higiene de los Alimentos (MINSAP)
 - Laboratorio de Supervisión de la Calidad CUBACONTROL S.A. (MINCEX)
 - Oficina Nacional de Normalización (CITMA)
 - Centro Nacional de Higiene de los Alimentos – IMV (MINAG)
 - Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical (MINAG)
 - Laboratorio Central de la Calidad (MINCIN)
 - Centro de Investigaciones Pesqueras (MINAL)
 - Centro Nacional de Inspección de la Calidad (MINAL)
 - Instituto de Investigaciones en Normalización (CITMA)
 - Instituto Cubano de Investigaciones Azucareras (MINAZ)
 - Instituto Nacional de Investigaciones en Metrología (CITMA)
- Es una adopción idéntica por el método de traducción del Procedimiento N° 4 (versión 3, 2009) “*Validation of Chemical Analytical Methods*” del Comité Nórdico de Análisis de Alimentos (NMKL); y mantiene el formato original del documento adoptado.
- Trata un tema de interés específico, demandado actualmente por los directivos de la Gestión de la Calidad en los laboratorios y otras partes interesadas y cubre una necesidad incuestionable. Es posible que estos enfoques puedan variar en el futuro y sea necesaria nuevamente la actualización del documento para adecuarlo a la evolución lógica de los conceptos y al desarrollo específico de esta temática. Los comentarios, sugerencias u opiniones sobre esta Especificación Técnica deben remitirse a NC, los cuales se tendrán en cuenta al realizar las futuras revisiones del documento.
- Sustituye a la NC-TS 368: 2004 Guía para la validación de métodos de ensayo químicos para alimentos.

© NC, 2010

Todos los derechos reservados. A menos que se especifique, ninguna parte de esta publicación podrá ser reproducida o utilizada en alguna forma o por medios electrónicos o mecánicos, incluyendo las fotocopias, fotografías y microfilmes, sin el permiso escrito previo de:

Oficina Nacional de Normalización (NC)

Calle E No. 261, Vedado, Ciudad de La Habana, Habana 4, Cuba.

Impreso en Cuba.

Índice

0	Introducción a la Norma Cubana	5
1	Introducción.....	6
2	Validación de un método químico	6
3	El procedimiento de validación	9
3.1	Plan	10
3.2	Especificidad	10
3.3	Curva patrón	12
3.4	Precisión	13
3.5	Veracidad	17
3.6	Concentración y rango de medición	21
3.7	Límite de detección	22
3.8	Límite de cuantificación	23
3.9	Robustez	23
3.10	Evaluación de los resultados de validación	24
4	Documentación de validación y verificación.....	24
5	Seguimiento.....	25
5.1	Seguimiento continuo	25
5.2	Supervisión para seguir los cambios en el procedimiento	25
6	Ejemplo de validación completa de un método interno.....	26
6.1	Especificidad (descrito en 3.2.).....	26
6.2	Curva patrón (descrito en 3.3.).....	31
6.3	Precisión (descrito en 3.4).....	35
6.4	Veracidad (descrito en 3.5)	37

6.5 Rango de medición (descrito en el capítulo 3.6).....	39
6.6 Limite de detección (descrito en 3.7)	40
6.7 Limite de cuantificación (descrito en 3.8).....	41
6.8 Robustez (descrito en 3.9)	41
7 Lista de palabras	42
Bibliografía.....	45
Anexo 1: Pruebas-t	47
Anexo 2: Tabla para las pruebas-t	48

0 Introducción a la Norma Cubana

La selección y desarrollo de métodos analíticos ha sido un tema importante para los laboratorios de ensayo que trabajan en el sector alimentario. En el camino hacia la adopción oficial de un método se prevé la necesidad de demostrar que el método puede aplicarse con buenos resultados. En la actualidad se va concediendo a los analistas mayor libertad en la elección de los métodos de ensayo, siempre y cuando el método elegido satisfaga determinados requisitos de calidad.

Hay países que exigen, siempre que sea posible, el uso de métodos validados en el control oficial de alimentos. Este requisito es aplicable en los laboratorios acreditados o que pretenden acreditarse, con independencia de su relación o no con el control oficial de alimentos.

Los laboratorios dan prioridad a aquellos métodos comprobados en ensayos interlaboratorios si están disponibles, a menos que el laboratorio tenga razones específicas para seleccionar otro método. Cuando no se dispone de esos métodos estudiados, se deben utilizar otros, que deben estar validados internamente. Un método comprobado en un ensayo colaborativo no debe ser introducido en la rutina de trabajo de un laboratorio antes de haber demostrado y documentado que el mismo es adecuado para la tarea analítica específica. En otras palabras, el laboratorio debe asegurarse, que el método es *“idóneo para el fin propuesto”*, no solamente que puede lograr las características de ejecución establecidas en el mismo.

Todos los laboratorios de cierto rango desarrollan métodos y por tanto han considerado requisitos de calidad de los métodos analíticos. Es un prerrequisito que aquellos laboratorios que trabajan en la validación interna de métodos empleen personal competente y tengan acceso a los equipos adecuados requeridos para la validación. El objetivo fundamental de esta guía, que puede llevarse a cabo en diferentes laboratorios, consiste en concebirlo de forma similar y según unas directrices definidas.

Esta guía describe los parámetros a investigar, sus definiciones, la forma en la cual debe trabajarse y los criterios para aceptar los métodos.

Exceptuando el Prefacio y esta Introducción a la NC, el resto del documento es una traducción fiel, del idioma inglés, de los aspectos técnicos del Procedimiento N° 4 (2009), versión 3, del Comité Nórdico de Análisis de Alimentos (NMKL): Validación de Métodos de Análisis Químico. Instituto Nacional Veterinario, PB 750 Centre, N-0106 Oslo, Noruega. Correo electrónico: nmkl@vetinst.no

GUÍA PARA LA VALIDACIÓN DE MÉTODOS DE ENSAYOS QUÍMICOS PARA ALIMENTOS

1 Introducción

Las autoridades que llevan a cabo análisis químicos relacionados con el control de alimentos, agua potable o alimentos para animales, los científicos que realizan análisis de conjunto con proyectos de investigación o asignaciones, y los laboratorios químicos individuales, todos necesitan conocer si un resultado de análisis es "correcto" o "bueno". En relación con la acreditación, es un requisito obvio que el método de análisis depende de la norma. Es importante tener conciencia del hecho de que la mejor manera de asegurar que los análisis de un laboratorio satisfagan todos los requisitos pertinentes, se logra participando en Programas de Ensayos de Aptitud (EA). Sin embargo, aunque el número de métodos de análisis disponibles y potenciales es siempre creciente, por diferentes razones, puede resultar imposible participar en un EA. Esto puede estar motivado, por ejemplo, por el hecho de que el análisis sea tan especializado que no lo realicen suficientes laboratorios.

Los usuarios de este procedimiento representan laboratorios de diferentes tamaños y con variados recursos. En algunos casos, puede ser apropiado ajustar el criterio sugerido a las actividades de cada laboratorio en particular. Esto significa, a su vez, que los laboratorios son libres para cambiar algunos criterios. Tales cambios deben ser documentados mediante adjuntos al procedimiento de validación del laboratorio en cuestión.

Aunque este procedimiento trata de la validación de un método, realmente se refiere a la validación de una unidad analítica. Esto trae consigo que los elementos tales como las premisas, los instrumentos, el equipo, los recursos humanos, los rangos de concentración definidos y las matrices definidas, están implícitamente incluidos en la validación. Por consiguiente, puede ser necesario repetir el proceso de validación si ocurren cambios en uno o más de estos elementos.

El concepto de incertidumbre de la medición no recibe un tratamiento profundo en este procedimiento. Esto se cubre en el Procedimiento No. 5 de NMKL: Estimación y expresión de incertidumbre de la medición en análisis químico (2005).

2 Validación de un método químico

La validación de un método significa el examen y la determinación de los parámetros del método. Esto o puede hacerse por un solo laboratorio (validación interna), o por varios laboratorios (estudio colaborativo). La verificación de un método es un examen de la habilidad de un solo laboratorio para realizar el análisis de acuerdo con los parámetros del método establecido en la validación.

Los parámetros importantes del método son (si son pertinentes para el actual método):

Campo de aplicación

Veracidad

Precisión

Valor HorRat (= $RSD_{\text{Obtenido}}/RSD_{\text{Esperado}}$)

Límite de cuantificación

Como puede observarse en la tabla debajo, la magnitud de la verificación realizada localmente en cada laboratorio depende de cuan completamente el método se ha validado externamente: una validación externa completa simplifica la verificación interna.

Es posible dividir métodos de análisis en 6 categorías, dependiendo del grado de validación que se haya documentado para el método:

	Grado de validación externa	Verificación interna recomendada
1	El método ha sido validado externamente en un estudio colaborativo.	Verificación de la veracidad y la precisión.
2	El método ha sido validado externamente en un estudio colaborativo, pero es utilizado en una nueva matriz o con un nuevo instrumento.	Verificación de la veracidad y la precisión, y posiblemente también el límite de cuantificación.
3	El método está bien establecido, pero no ha sido validado externamente en un estudio colaborativo.	Verificación, y posiblemente una validación interna más extensa.
4	El método ha sido publicado en una literatura científica y declara importantes características de desempeño.	Verificación, y posiblemente una validación interna más extensa.
5	El método ha sido publicado en una literatura científica, pero carece de importantes características de desempeño.	Validación interna completa.
6	El método ha sido desarrollado internamente.	Validación interna completa.

Hay que enfatizar en que algunos métodos, aunque hayan sido emitidos por instituciones de normalización, no han sido validados a través de estudios colaborativos.

Que el *método se haya validado externamente en un estudio colaborativo* significa que ha sido concluido un estudio colaborativo de acuerdo con directrices internacionalmente aceptadas, por ejemplo ISO 5725 (1994-1998), Horwitz (1995) o NMKL Protocolo No. 1 (2005), con resultados aceptables. Además, debe estar disponible un informe del estudio colaborativo que contenga la información sobre los parámetros del método que son pertinentes para el método en cuestión. Cada vez con más frecuencia, se está convirtiendo en una práctica común incluir los resultados de los estudios colaborativos en el propio texto del método, o publicarlo como un informe aparte referido en la descripción del método.

Por *verificación* se entiende que el laboratorio, antes de utilizar el método en las asignaciones rutinarias, ensaye y documente su competencia en el uso del método. Esto significa que el laboratorio ensaye y documente que está en condiciones de obtener resultados de veracidad y precisión que se correspondan con los del estudio colaborativo. Ante todo, el laboratorio debe demostrar que el método es apropiado para resolver la tarea analítica en cuestión.

Por una *validación más extensa* se entiende que el laboratorio examina y documenta, totalmente o en parte, las características del método (vea sección 3) antes de tomarlo para el uso rutinario.

Por *validación interna completa* se entiende una evaluación de todas las características más importantes del método (vea sección 3).

La magnitud de la validación está determinada por el propósito del método. Los métodos que serán usados en el control público de alimentos requieren la validación completa de acuerdo con punto 1 de la tabla, mientras que los métodos que serán usados internamente en la gestión de proceso, pueden necesitar sólo una simple verificación. En los métodos que serán utilizados en asignaciones de clientes internos o externos, el laboratorio o el cliente determinan libremente cuán estricta deberá ser la verificación.

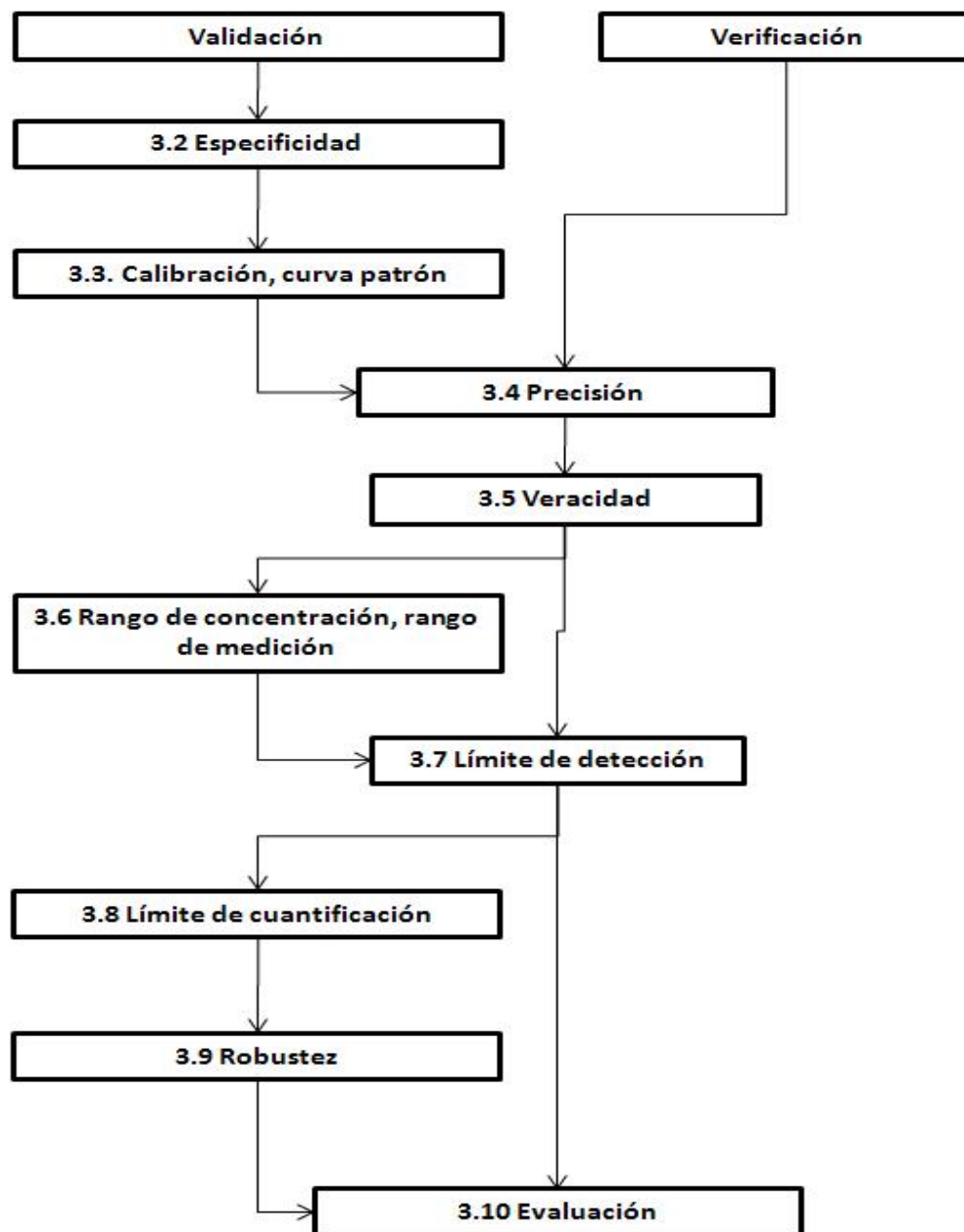
Los métodos que se utilizan en concentraciones próximas al límite de detección, a menudo requieren de una validación más extensa en los niveles más bajos que los métodos utilizados en concentraciones lejanas al límite de detección.

La magnitud de la validación también depende de si el análisis es cuantitativo o cualitativo, y de cuáles principios de análisis se utilicen.

La validación interna o verificación siempre debe realizarse para todo nuevo método analítico antes de que sea aceptado para el uso como análisis de rutina. Este trabajo debe ser repetido en todo o en parte si el resultado de la primera validación o verificación lo hace necesario para modificar el método.

El rango de concentración aplicable y la matriz de la muestra constituyen una parte importante de la validación o verificación del método del análisis. A menudo, ambos, ahorran tiempo y esfuerzo para determinar el área de aplicación según las necesidades del laboratorio, en lugar de las limitaciones del método. También es importante que el informe de validación y verificación describa las matrices de la muestra que hayan sido utilizadas. La función de algunos métodos puede depender, por ejemplo, de la matriz. En tales casos, es muy importante asegurar que toda el área de aplicación declarada quede incluida en la validación.

El trabajo de validación y verificación no comenzará hasta que el desarrollo del método se considere concluido. No es posible realizar cambios al método durante el proceso de validación o verificación. Si el método se modifica, deberá repetirse completamente el proceso de validación o de verificación.



3 El procedimiento de validación

El diagrama de flujo de la página anterior indica cuáles elementos son incluidos en un proceso de validación y de verificación.

En los puntos 3.2-3.9 se describen los elementos que deben examinarse en una validación interna completa de un método de análisis. Si, en una validación interna, se omiten algunos de estos puntos, debe documentarse la razón para ello.

Los puntos 3.4 (precisión) y 3.5 (veracidad) describen los elementos que deben examinarse en una verificación. Esto puede complementarse con los elementos del apartado 3.7 (límite de cuantificación).

3.1 Plan

Antes de comenzar la parte experimental de la validación o de la verificación, se debe preparar un plan de trabajo. El plan incluirá una apreciación global sobre el propósito para el cual el método será utilizado, y debe tener en cuenta los siguientes factores:

- ✓ Necesidades del cliente
 - Requisitos de las autoridades de control
- ✓ Posibilidad analítica
- ✓ Condiciones internas del laboratorio
 - Legislación ambiental vigente
 - Equipamiento
 - Recursos

El plan de validación debe contestar las siguientes preguntas, en la medida que ellas son pertinentes para el método: (ver próxima página).

El plan de validación y de verificación describirá cuáles elementos de validación serán evaluados, y en que orden esto tendrá lugar. También debe declarar los requisitos que el laboratorio establece para los diferentes puntos del plan. Si el cliente no requiere especificaciones relacionadas con la repetibilidad o la reproducibilidad, el propio laboratorio declarará los requisitos analíticamente razonables para el método.

3.2 Especificidad

Definición: La especificidad es la habilidad de un método analítico de distinguir el analito que va a ser determinado de otras sustancias presentes en la muestra.

Se analiza un blanco y una o más muestras a las cuales se ha añadido una cantidad conocida del analito para verificar que no hay ninguna interferencia con el mismo debida a otros compuestos presentes en la muestra, o de productos de degradación, o metabolitos, o aditivos conocidos. En algunos casos, como por ejemplo en el análisis de pesticidas, debe analizarse un extracto más concentrado del blanco para demostrar que no se produce ninguna señal.

PREGUNTA	COMENTARIO
¿Para qué propósito va a ser utilizado el método?	Ejemplo: Control público de alimentos, control de producción continua en una compañía industrial.
¿La selección del principio analítico influyen en los requisitos de reproducibilidad?	
¿Se requiere un resultado cualitativo o cuantitativo?	Esta consideración afecta la especificidad, el límite de detección, el límite de cuantificación, etc.
En que forma química aparece el analito: - ¿Enlazado o libre? - ¿En diferentes compuestos químicos?	Se tiene presente en la selección de las matrices de muestra seleccionadas para la validación de los ensayos de recuperación.
¿Cuál es el área de aplicación del método?	
¿Hay riesgo de interferencia de la matriz de la muestra u otros analitos?	Afecta los requisitos de selectividad y la especificidad.
¿Cuánta muestra está disponible y es homogénea la misma?	Se tiene presente en los requisitos de la reproducibilidad, repetibilidad o especificidad.
En que rango de concentración se utilizará el método: ¿Próximo al límite de cuantificación o a mayores concentraciones?	Afecta los requisitos de linealidad, límite de detección, límite de cuantificación, reproducibilidad y repetibilidad.
¿Cómo se asegurará la veracidad?	Comparando con materiales de referencia pertinentes o participando en programas de ensayos de aptitud.
Qué requisitos medioambientales deben cumplirse: - ¿Consideraciones respecto a la seguridad del personal? - ¿Descargas peligrosas al medio ambiente?	Las condiciones circundantes pueden influir en el análisis a través de temperaturas extremas o partículas en el aire. Esta consideración afecta los requisitos de robustez, y así indirectamente, los requisitos para el personal, el equipamiento, los reactivos y el local.
¿Cuáles son las limitaciones financieras?	En laboratorios con actividad comercial: Si el uso futuro del método genera ingresos menores que el costo de validarlo, sería poco sensato utilizarlo.

La especificidad de un método se comprueba comparándolo con otros métodos basados en otros principios de análisis. La especificidad también puede comprobarse llevando a cabo las

determinaciones en presencia de sustancias sospechosas de interferir con el analito. Sin embargo, el analista debe estar consciente del hecho de que el analito puede estar presente en la muestra en más de una forma química.

Por experiencia, los analistas están familiarizados a menudo con el tipo de interferencia esperada para un método dado, como pueden ser las interferencias espectrales en análisis de ICP o tiempos de retención idénticos para varias sustancias al utilizar la cromatografía. Tales problemas pueden tener un impacto desafortunado en el resultado del análisis, y estos métodos requieren, por consiguiente, un examen más extenso de la especificidad que aquellos asociados con ninguna o pocas interferencias.

3.3 Curva patrón

Definición: Una curva patrón es una función que refleja la correlación entre el contenido de un analito en una muestra, y la resultante respuesta de la medición.

La curva patrón debe determinarse por un cierto número de puntos de mediciones pertinentes, dependiendo del método y del producto.

En adelante, se supone una correlación lineal, por lo menos en el rango de medición pertinente. Los análisis se realizan en muestras de referencia con un contenido conocido o blancos con una concentración conocida de analito añadido. Es de suma importancia que los puntos para la determinación de la curva patrón se hallen dentro del rango de medición, lo cual es importante para la utilización del método en la práctica.

El experimento debe repetirse por lo menos una vez. Los resultados deben presentarse gráficamente y se debe informar la ecuación de regresión lineal, así como el coeficiente de la correlación para cada uno de estos experimentos.

Si la correlación no es lineal, pueden estimarse los parámetros en la curva pertinente, ya sea utilizando el método de los mínimos cuadrados, o por medio de métodos numéricos si el problema no puede resolverse analíticamente.

Para calibraciones multivariadas, refiérase a Martens y Næs (1989).

La linealidad no puede evaluarse basado sólo en el tamaño de la correlación, pero como recomienda Tiley (1985): Si s_1^2 es la varianza del error ajustado:

$$s_1^2 = \frac{1}{n-2} \sum (y - \hat{y})$$

Donde y representa el valor y medido, \hat{y} los valores estimados basados en la ecuación de regresión, y n es el número de pares de puntos (x,y) . La desviación típica para las y 's, es decir la precisión de las y 's, viene dada por:

$$s_2^2 = \frac{1}{n-1} \sum (y - \bar{y})^2$$

Los valores s_1^2 y s_2^2 son estocásticamente independientes, y

$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2}$$

Si la distribución F para $n-2$ y $n-1$ grados de libertad (ver por ejemplo Draper and Smith (1981), capítulo 1.3.) bajo la hipótesis cero:

H_0 : *La correlación entre x e y es lineal.*

Si la prueba F conlleva a rechazar H_0 , puede concluirse que la correlación no es lineal.

Los métodos de espectrométricos muy a menudo tienen una zona de estandarización lineal hasta una cierta concentración. A concentraciones superiores, la curva se desvía hacia el eje de la concentración.

El tamaño de la zona lineal debe ser examinado, a menos que el método sea utilizado para un rango muy limitado de propósitos donde el rango de la concentración pertinente ya se conoce y caiga dentro de la zona lineal. También es necesario asignar en qué parte de esta zona se cumplen los requisitos del método para la precisión y la veracidad. Esto producirá una limitación en el extremo inferior de la curva patrón que toma la forma de límite de cuantificación.

Un electrodo de ión selectivo muestra a menudo una respuesta que es una función lineal del logaritmo de la concentración para un amplio rango de concentración, pero produce una inclinación hacia el eje donde se obtiene la respuesta (eje y) cuando la concentración tiende a cero (eje x). El límite de cuantificación puede definirse entonces como el punto más bajo de la parte lineal de la curva patrón. Si los análisis arrojan resultados fuera de la zona lineal, se recomienda diluir las muestras para que los resultados caigan dentro de dicha zona. En algunos casos es más apropiado utilizar una curva patrón no lineal; bien porque es deseable ir fuera de la zona lineal, o bien debido al uso de detectores con respuesta no lineal, lo cual es difícil de convertir en lineal utilizando funciones matemáticas. Un ejemplo de esto es el detector fotométrico de llama de azufre utilizado en la cromatografía gaseosa. En el caso de no linealidad, es necesario identificar también el rango de concentración en que se aplica la correlación entre la concentración y la respuesta, y si se cumplen los otros requisitos de calidad del método.

3.4 Precisión

Definición: Precisión es el grado de concordancia entre los resultados de análisis independientes obtenidos bajo condiciones específicas.

3.4.1 Determinaciones cuantitativas

La precisión de un análisis sólo depende de la distribución de los errores aleatorios del análisis, y no debe confundirse con la veracidad. Normalmente se expresa la precisión como la desviación típica de los resultados analíticos. Una desviación típica pequeña equivale a una elevada (o buena) precisión, y una desviación típica grande equivale a una baja (o pobre) precisión. El concepto de precisión sólo es apropiado para los análisis cuantitativos.

La precisión es un concepto relativo, totalmente dependiente de las "condiciones específicas" mencionadas anteriormente en la definición: los extremos son las condiciones de repetibilidad y

de reproducibilidad.

Definición: Repetibilidad significa que los resultados de análisis son obtenidos utilizando el método analítico en muestras idénticas por el mismo laboratorio, utilizando el mismo equipamiento y en un corto intervalo de tiempo.

Reproducibilidad significa que los resultados se obtienen utilizando el método analítico en muestras idénticas en diferentes laboratorios y utilizando equipos diferentes.

Reproducibilidad interna significa que la determinación se lleva a cabo en momentos diferentes, por personas diferentes y con diferentes lotes de reactivos, pero en el mismo laboratorio.

Hay que enfatizar en que la precisión es usualmente dependiente de la técnica analítica, y con mucha frecuencia también de la concentración del analito.

Para estimar la precisión, se analiza un cierto número de muestras paralelas del mismo material. Las otras condiciones (equipo, personas, tiempo, etc.) pueden estar de acuerdo con los requisitos de repetibilidad, reproducibilidad o algo intermedio. La desviación típica se calcula en base a determinaciones de réplicas simples o sobre determinaciones duplicadas.

La desviación típica de determinaciones simples es una estimación de la varianza alrededor de la media, mientras que la desviación típica derivada de determinaciones duplicadas es una estimación de las variaciones medias de la diferencia entre dos análisis simples.

Determinaciones simples:

La desviación típica se define como:

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

la cual por razones técnicas de cálculo también puede escribirse así:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n x_i^2 - n\bar{x}^2}{n-1}}$$

donde x_1, x_2, \dots, x_n son las determinaciones individuales, y

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

es la media de los valores x_i .

La desviación típica se calcula en la práctica por medio de un programa completamente comprobado en hoja de cálculo o mediante un programa estadístico. (Al usar hojas de cálculo o calculadoras; observe que algunos de ellos calculan la desviación típica con n en lugar de $n-1$ en el denominador.)

Determinaciones duplicadas:

Una determinación duplicada consta de dos mediciones; x_i y y_i . La desviación típica es la

desviación típica promedio de todos los pares. Debido a que la varianza basada en 2 observaciones, x y y , se reduce a

$$\frac{(x - y)^2}{2},$$

el promedio de los n pares es:

$$\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \frac{(x_i - y_i)^2}{2} = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - y_i)^2}{2n}$$

y a nivel de la desviación típica (la raíz cuadrada de la varianza):

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - y_i)^2}{2n}}$$

La precisión se expresa directamente como:

- La desviación típica, s

- la desviación típica relativa: $RSD = \frac{s}{\bar{x}} 100 \%$

- el intervalo de confianza: $\left(\bar{x} - c \frac{s}{\sqrt{n}} ; \bar{x} + c \frac{s}{\sqrt{n}} \right)$

La constante c es dependiente del nivel de confianza, y se halla en una tabla de la distribución-t para $n-1$ grados de libertad. Para el nivel de confianza $1-\alpha$, c es igual al fractil $(1-\alpha/2)$. Con mucha frecuencia se utiliza $c=3$. Esto es aproximadamente igual a un intervalo de confianza de 99% cuando el número de mediciones es 15. $c=2$ da un intervalo de confianza de aproximadamente 95%. (Vea Anexo 2: Tablas para pruebas-t. 15 mediciones indican $GL=14$, y un intervalo de confianza de 99% corresponde a $\alpha=1\%$ ó 0,01 y $1-\alpha/2=0,995$. $GL=14$ y una probabilidad de 0,995 produce un valor de c de 2.9768 ≈ 3 . Un intervalo de confianza de 95% corresponde a $\alpha=5\%$ ó 0,05 y $1-\alpha/2=0,975$. $GL=14$ y una probabilidad de 0,975 produce un valor de c de 2.1448 ≈ 2 .)

La tabla que sigue contiene los valores de las desviaciones típicas relativas esperadas para diferentes concentraciones. La tabla está basada en un número grande de estudios colaborativos, y está tomada de Pocklington (1990). Una desviación típica de la reproducibilidad no mayor de dos veces el valor declarado en la columna 2, es considerado aceptable según Pocklington. Sin embargo, ésta no es una verdad universal establecida para siempre. Por ejemplo, los requisitos de EU estipulan que para los métodos analíticos de plomo, cadmio y mercurio en relación con el control público, este valor no debe ser mayor de 1,5 (EU (2001)).

1	2	3	4	5
Concentración	RSD% (Reproducibilidad)	Reproducibilidad aceptable	RSD% (Repetibilidad)	Repetibilidad aceptable
10^{-1}	2.8	5.7	1.9	3.8
10^{-2}	4.0	8.0	2.7	5.3
10^{-3}	5.6	11	3.8	7.5
10^{-4}	8.0	16	5.3	11
10^{-5}	11	23	7.5	15
10^{-6}	16	32	11	21
10^{-7}	22	45	15	30

Para concentraciones inferiores a 10^{-7} se recomienda considerar una RSD de 22% (M.Thompson, Analyst, 2000).

La experiencia ha demostrado que los valores de las desviaciones típicas de la repetibilidad son $\frac{1}{2}$ - $\frac{3}{4}$ del valor de las desviaciones típicas de la reproducibilidad (vea columna 4). (Los números en la tabla están redondeados a 2 cifras significativas. Ésta es la razón por la cual los números en las columnas 3, 4 y 5 no son exactamente siempre los resultados que se obtendrían basados en los números de la columna 2).

En lugar de utilizar la tabla, es posible entrar los valores reales en la fórmula en la cual se fundamenta la tabla; es decir el valor HorRat (Relación de Horwitz):

$$\text{HorRat} = \frac{RSD_{\text{obtenida}}}{RSD_{\text{pronosticada}}}$$

La RSD_{obtenida} es la desviación típica relativa de la reproducibilidad de un estudio colaborativo, mientras que la $RSD_{\text{pronosticada}}$ es un valor empírico basado en un número grande (aproximadamente 10 000, pr. Julio 2004) de estudios colaborativos:

$$RSD_{\text{pronosticada}} = 2^{(1-0.5 \log C)} = 2C^{-0.5 \log 2} \approx 2C^{-0.1505}$$

Donde el C es el valor medio de las mediciones de concentraciones de masa (medidas en mg/g, g/kg, $\mu\text{g/g}$ o una unidad similar). Utilizando la fórmula en lugar de la tabla, es posible evitar problemas en casos marginales: el requisito de $\text{HorRat} \leq 2$ debe dar el mismo resultado aproximadamente si las mediciones de los valores están cerca de 9×10^{-3} ó 1×10^{-2} , es decir alrededor de 0.009 ó 0.010. Si se utiliza la tabla indiscriminadamente, la desviación típica de la reproducibilidad relativa aceptable es igual a 11 para 9×10^{-3} , y a 8.0 para 1×10^{-2} . Pero si empleamos la fórmula para $C=9 \times 10^{-3}$ y $C=1 \times 10^{-2}$, los requisitos serán 8.1 y 8.0, respectivamente. Según Horwitz (1995), su fórmula está basada sólo en concentraciones de masa, y por consiguiente, no puede utilizarse sin consideraciones adicionales, para otros tipos de mediciones.

3.4.2 Determinaciones cualitativas

Las determinaciones cualitativas son normalmente binarias, es decir producen uno de dos posibles resultados, tales como: sí/no, 1/0, por encima de/por debajo de una concentración umbral, etc. La precisión de un análisis cualitativo puede expresarse como la fracción porcentual de falsos positivos y falsos negativos:

$$\% \text{ de falsos positivos} = \frac{\text{Número de falsos positivos}}{\text{Suma de negativos conocidos}} 100\%$$

$$\% \text{ de falsos negativos} = \frac{\text{Número de falsos negativos}}{\text{Suma de positivos conocidos}} 100\%$$

3.5 Veracidad

Definición: Veracidad es el grado de concordancia entre el contenido verdadero de un analito específico en una muestra y el resultado del análisis.

El resultado puede ser un solo valor o una función de algunos valores simples. Tal función normalmente es el valor medio, pero en algunos casos puede ser apropiado utilizar valores de la mediana u otras formas modificadas de valores medios.

Es importante reconocer el hecho de que el contenido verdadero del analito en una muestra siempre es desconocido. Para evaluar la veracidad de un método, es por consiguiente necesario depender de los resultados aceptados como:

- contenido certificado de un material de referencia
- resultados obtenidos utilizando un método validado (con tal de que la muestra(s) con un contenido conocido haya sido incluida en el estudio colaborativo)
- resultados de un ensayo de aptitud (EA)

Los tres casos anteriores incluyen los resultados de varios laboratorios, analistas e instrumentos, así se minimiza el efecto de los errores individuales.

La veracidad es un factor importante en la evaluación de todos los tipos de métodos analíticos cuantitativos. Esto también se aplica a los métodos que definen su propia área de aplicación. Además, siempre será de gran importancia obtener resultados comparables a los resultados obtenidos por otros laboratorios que utilizan el mismo método.

Algunos métodos analíticos definen su propio resultado de la medición, y el área de aplicación queda entonces implícita. Ejemplos: N-Kjeldahl (definido como la cantidad de nitrógeno medida en un análisis Kjeldahl) y cantidad de sólidos (secado a 105 °C, secado a vacío a 70 °C o liofilización).

Para ambas, veracidad y precisión, los requisitos serán dependientes del nivel de concentración y del propósito del análisis. Por ejemplo, en análisis de trazas una desviación de más de 10% puede ser aceptable tanto para la precisión como para la veracidad, mientras que tales desviaciones serían totalmente inaceptables al medir N-Kjeldahl o sólidos.

3.5.1 Análisis para los cuales se dispone de materiales de referencia certificados u otros materiales de referencia

El Procedimiento NMKL No. 9 (2007) incluye una descripción más detallada de resultados de análisis a partir de materiales de referencia certificados.

La veracidad de un método puede ser examinada analizando un material de referencia certificado. Si no se dispone de un material de referencia certificado, utilice otro material de referencia o un material que se haya preparado en el laboratorio (patrón interno) con un contenido conocido del analito. El contenido del analito en dicho material de control debe examinarse completamente, preferentemente utilizando dos o más métodos analíticos basados en principios físicos y/o químicos diferentes, y organizado de forma tal que los análisis se realicen en más de un laboratorio. Un patrón interno, siempre que sea posible, debe ser calibrado contra un material de referencia certificado. No evaluar con precisión la concentración del analito al aplicar un patrón interno es una infracción seria en los procedimientos de aseguramiento de la calidad de un laboratorio.

Un material de referencia certificado o un patrón interno deben estar basados en una matriz, y tener una concentración del analito que cubra el de las muestras para análisis hasta donde sea posible. Es importante estar consciente del hecho de que sólo pueden utilizarse materiales de referencia certificados u otros materiales de referencia para evaluar el método analítico en el nivel de concentración examinado.

Los materiales certificados y otras muestras de control no siempre son representativos de una muestra "típica" en un laboratorio de control de alimentos. Los materiales certificados pueden ser:

- más fáciles para manejar
- más fáciles para extraer
- más fáciles para incinerar
- más homogéneos
- y tener menos interferencias que las muestras de alimentos reales.

Debido a esto, los resultados obtenidos en muestras de referencia son a menudo mejores que los resultados obtenidos con muestras reales. Esto puede dar un sentido falso de seguridad y no es posible utilizar únicamente los resultados de análisis de materiales de referencia como prueba de la veracidad de un análisis en una muestra de alimento desconocida.

El análisis de materiales de referencia únicamente no puede verificar la veracidad del método. Estos análisis deben complementarse con otros criterios de fiabilidad, como los ensayos de recuperación.

3.5.2 Análisis para los cuales se dispone de métodos de referencia

Definición: En este contexto, un método de referencia es un método analítico que se ha estudiado en un estudio colaborativo con buenos resultados, y el cual tiene una veracidad aceptable.

La veracidad del método analítico puede ser examinada analizando la misma muestra por ambos métodos, el método a validar internamente, y el método de referencia. Si el laboratorio no ha adoptado aún el método de referencia, hay sólo una pequeña proposición, introducirlo para evaluar el nuevo método analítico. En tales casos, se recomienda enviar las muestras a otro laboratorio, preferentemente uno que esté acreditado para el método en cuestión, y tenga muestras analizadas allí.

La realización de una prueba-t (Anexo 1), o alternativamente un análisis de varianza sirven para determinar si hay diferencia significativa o no entre los resultados obtenidos por el método de referencia y aquéllos obtenidos por el método a validar internamente.

3.5.3 Análisis para los cuales se dispone de programas organizados de EA

La veracidad del método analítico se examina participando en un programa-EA con muestras equivalentes al tipo de muestra para el cual se utilizará el método. La veracidad documentada sólo se aplica al rango de concentración y matrices incluidas en el programa-EA.

Si tales ensayos no existen, comparaciones más pequeñas con pocos laboratorios, incluso con sólo otro laboratorio, puede en algunos casos proporcionar valiosa información.

Se supone que el laboratorio que organiza el EA puede documentar su competencia como se especifica en ISO/IEC Guide 43 (1996) o Thompson et al (2006).

3.5.4 Análisis para los cuales no se dispone de materiales de referencia certificados, métodos de referencia o diseños de ensayos de aptitud

Definición: El concepto de recuperación cubre realmente dos conceptos (Burns et al. 2002): Factor de Recuperación que es el rendimiento del paso de concentración o extracción en un proceso analítico dividido por la cantidad de analito en la muestra original.

Recuperación aparente que es el valor observado en un método analítico que utiliza una función de calibración dividida por el valor de referencia.

Si no están disponibles ni materiales de referencia certificados, ni métodos de referencia ni EA's, es necesario hacer uso de otros métodos para asegurar la veracidad de los análisis. Además, es sumamente importante que el laboratorio tome medidas adicionales de aseguramiento de la calidad, y coopere con un laboratorio reconocido para el intercambio de muestras y resultados, así como de las experiencias pertinentes.

La recuperación es un método conveniente que puede utilizarse cuando los recursos mencionados en el título no están disponibles.

Como se ha demostrado por Burns et al. (2002), este concepto, sin embargo, no siempre es utilizado por todos de la misma manera. En el artículo antes mencionado, hay una distinción entre la recuperación y la recuperación aparente. La recuperación (representada por R) se usa en relación con una concentración tope o paso de extracción en un método analítico:

$$R = \frac{Q_{hallada}}{Q_{original}}$$

Donde:

$Q_{hallada}$ es la cantidad del analito recuperado después de procesar la muestra, y $Q_{original}$ es la cantidad original, conocida. Si se utiliza la adición de patrón o la contaminación, la recuperación se calcula según la fórmula siguiente:

$$R = \frac{Q_{hallada} - Q_{muestra\ original}}{Q_{añadida}}$$

Donde:

$Q_{hallada}$ es la cantidad de analito medido (es decir la cantidad original de analito más la cantidad agregada), $Q_{muestra\ original}$ es la cantidad de analito medido en la muestra original, y $Q_{añadida}$ es la cantidad agregada de analito.

Cuando la recuperación se utiliza en un proceso analítico que incluye una curva de calibración, se define como sigue:

$$R' = \frac{x}{x_{ref}}$$

Donde:

x es el valor leído, y x_{ref} es un valor de referencia que procede de un material de referencia certificado. Cuando se utiliza la contaminación, se aplica la definición siguiente:

$$R' = \frac{x_{(o+s)} - x_{(o)}}{x_{(s)}}$$

Donde:

$x_{(s)}$ es la cantidad agregada para contaminar, $x_{(o)}$ es la cantidad medida en el material original, y $x_{(o+s)}$ es la cantidad medida en la muestra contaminada.

La razón para diferenciar entre R y R', es que la línea de calibración puede tener error sistemático, aditivo y multiplicativo, ambos inclusive:

$$x = a + bx_{ref}$$

Donde:

a y/o b son diferentes de 0. Así, R' en principio puede ser mayor de 100%, y puede ser igual a 100%, sin ninguna garantía de que el método esté funcionando perfectamente. Por consiguiente, es esencial que el método, en tales casos, se valide utilizando algún material de referencia, o utilizando un intervalo conveniente de cantidad del analito.

Un método analítico con una curva de la calibración lineal no requiere una recuperación (R) de 100% en un proceso de concentración o de extracción. Se requiere que la muestra desconocida y las muestras de calibración tengan la misma recuperación para que (R) sea 100%.

La técnica es especialmente conveniente para analitos inestables, o en casos donde se realizan sólo pocos análisis. Es importante que los ensayos de recuperación se lleven a cabo en el rango de concentración pertinente para el análisis. Si en el futuro el método se utilizara para varios niveles, los ensayos de recuperación deben efectuarse en una selección de estos niveles.

La gran ventaja de utilizar ensayos de recuperación es que la matriz es representativa de muestras auténticas. La técnica puede utilizarse en todo los analitos y en la mayoría de los tipos de muestras, con tal de que el analito exista como un compuesto químico sintético estable en el laboratorio. La mayor limitación de este método es el hecho de que los analitos en la muestra natural pueden estar fuertemente unidos a la matriz, física o químicamente, lo cual no sucedería normalmente en el caso del analito agregado. Esto significa que es absolutamente posible obtener un porcentaje de recuperación alto para el analito agregado, sin poder obtener una determinación completa del analito naturalmente presente.

Si el resultado de recuperación cae dentro de los límites de 80%-110%, es suficiente a menudo analizar 3 veces la serie (es decir al menos 5 muestras con adición y 5 muestras sin adición). Los análisis deben llevarse a cabo dentro de un intervalo de tiempo limitado. Una regla general es que mientras más baja sea la concentración del analito, mayor cantidad de determinaciones deben efectuarse para obtener estimaciones satisfactorias del rendimiento. La razón de esto se debe a que los errores aleatorios medidos como desviaciones típicas relativas, aumentan al disminuir la concentración del analito. Para comprobar si el porcentaje de recuperación establecido es significativamente diferente de 100%, es posible utilizar un prueba-t simple (vea Anexo 1).

3.6 Concentración y rango de medición

Definición: El rango de medición es el intervalo de concentraciones para el cual el método se valida, con una veracidad y precisión aceptables.

Todos los métodos tienen una sensibilidad limitada que restringe el rango de concentración apropiado para el método. El límite inferior para obtener una cuantificación fiable se llama límite de cuantificación, y es tratado en la sección 3.8.

3.7 Limite de detección

3.7.1 Determinaciones cuantitativas

Definición: El límite de detección es la cantidad de analito que corresponde a la señal medida más baja, que con una confianza estrictamente definida puede interpretarse como una indicación de que el analito está presente en la muestra, pero sin permitir su exacta cuantificación.

El límite de detección está basado en la desviación típica de muestras naturales que no contienen el analito, blancos o muestras naturales, o patrones con muy bajo contenido de analito. Por "bajo contenido" se entiende un contenido lo más próximo posible al límite de detección esperado.

Procedimiento: Analice cierto número (n) de blancos de muestra (al menos 20), y defina el límite de detección como una constante c multiplicada por la desviación típica de la concentración media de los blancos de muestra. La constante c se halla en una tabla que contiene la distribución-t con n-1 grados de libertad y nivel 1- α . El valor normalmente usado es $\alpha=1\%$, es decir $\alpha=0.01$. Para $\alpha=0.01$ y n=20, el valor aproximado y frecuentemente utilizado de la tabla es c=3.

El límite de detección también se puede determinar por medio de la desviación típica de soluciones patrones con concentraciones sumamente bajas o blanco de muestras, añadiendo pequeñas cantidades del patrón.

Para algunos métodos analíticos, no es posible obtener una señal definida para el blanco. Como último recurso en tales casos, es posible intentar amplificar la interferencia instrumental, y especificar el límite de detección como c veces la desviación típica de la interferencia.

Al amplificar la interferencia instrumental debe utilizarse el extracto del blanco. Este extracto debe estar significativamente más concentrado que el blanco normal, para establecer que ningún componente está interfiriendo con la determinación del analito.

El límite de detección es particularmente importante en todos los análisis de trazas, pero es menos significativo en la evaluación de métodos utilizados para determinar componentes principales en alimentos.

3.7.2 Determinaciones cualitativas

Definición: El límite de detección es la concentración de umbral por debajo de la cual la identificación positiva no es confiable según los requisitos establecidos para la confiabilidad.

Se recomienda primeramente examinar en qué rango de concentración el método produce resultados correctos. Esto se hace analizando una serie de muestras que incluya un blanco de muestra y muestras que contengan diferentes concentraciones del analito. Se recomienda efectuar por lo menos 10 paralelos en cada nivel de concentración. Prepare una curva respuesta trazando los resultados positivos en el eje Y y la concentración en el eje X. Es posible entonces leer de la curva la concentración de umbral a la que el método deja de ser confiable. En el

ejemplo de abajo, la confiabilidad del método de detección es menor del 100% a concentraciones inferiores a 100 µg/g.

Concentración (µg/g)	n	Positivo	Negativo	Positivo/negativo (%)
25	10	0	10	0
50	10	1	9	11
75	10	5	5	50
100	10	10	0	∞
200	10	10	0	∞

3.8 Límite de cuantificación

Definición: La cantidad más baja de un analito que puede determinarse cuantitativamente con una confianza estrechamente definida.

Analice varios blancos de muestra. El límite de cuantificación es 10 veces la desviación típica del promedio del blanco de muestra.

Aquí, también, es posible añadir cantidades pequeñas del patrón, como se describe en la sección 3.7.1.

En la sección 3.7.1 se describe el uso de la interferencia instrumental como base para determinar el límite de cuantificación.

3.9 Robustez

Definición: Sensibilidad de un método analítico a desviaciones menores en las condiciones experimentales del método. Se dice que un método es robusto cuando no es influido por esas desviaciones menores bajo las condiciones experimentales mencionadas.

Alguna forma de prueba para la robustez debe ser incluida en la evaluación de los métodos analíticos que se elaboran en un laboratorio. En la literatura relacionada se recomienda realizar pruebas de robustez antes de comenzar un estudio colaborativo. La naturaleza del método analítico en cuestión determinará cuáles parámetros necesitan ser ensayados. Los parámetros más frecuentemente ensayados, los cuales pueden resultar críticos para un método analítico son:

- composición de las muestras
- lote de reactivos
- pH
- tiempo de extracción
- temperatura
- presión
- velocidad de flujo líquido
- volatilidad

Pueden utilizarse blancos de muestra para las pruebas de robustez en la medida que ellos revelen los efectos causados por la matriz o el lote de reactivos. Se puede utilizar información de la prueba de robustez para especificar las condiciones bajo las cuales un método debe ser empleado.

Remítase a Steiner (1975) para información más detallada sobre las pruebas de robustez.

3.10 Evaluación de los resultados de validación

Es importante comparar en todo momento lo que sucede realmente durante el proceso de validación y verificación con respecto al plan original. Si no se cumplen las especificaciones deseadas para la linealidad o la veracidad, el método debe ser modificado o cambiado, y en ambos casos, debe repetirse el trabajo de validación y verificación.

4 Documentación de validación y verificación

La documentación puede ser dividida en 5 categorías diferentes:

1. Planificación y preparaciones (vea sección 3.1).
2. Documentación de datos primarios para los experimentos (vea sección 3.2, 3.3).
3. Documentación de la evaluación de los datos de validación (vea sección 3.4-3.9).
4. Comparación y evaluación de los resultados de validación (vea sección 3.10).
5. Informe de validación o verificación los cuales son escritos al concluir completamente el trabajo.

Este informe contendrá:

- Todos los datos originales o una referencia de dónde éstos pueden hallarse.
- Una especificación exacta de las características examinadas. Si no todas las características fueron examinadas, las razones de ello deben ser informadas.
- Resultados obtenidos y formas de cálculo. Es especialmente importante incluir las matrices utilizadas y aquellas concentraciones que cumplen con la precisión específica, la veracidad, y los límites de detección y cuantificación específicos.
- Un informe de cómo evaluar los resultados obtenidos respecto al plan de validación o de verificación.
- Una conclusión inequívoca relacionada con las tareas analíticas para las cuales el método examinado se aplica satisfactoriamente. Deben señalarse en el informe aquellas matrices o concentraciones para las cuales el método resulte impropio.

Los laboratorios acreditados seguirán las reglas de la sección 4.3. de la NC ISO/IEC 17025 (2006) para la documentación y archivo . Todos los informes deben archivarse junto con su plan correspondiente, y deben conservarse con tal de que el método correspondiente sea archivado. Estos informes y los informes relacionados con el seguimiento periódico estarán disponibles para todos los analistas que utilicen el método.

Es esencial registrar exactamente cómo y en cuáles materiales se han determinado la repetibilidad o la reproducibilidad interna (material de referencia, materiales de control, muestras auténticas o soluciones sintéticas). Si el método analítico objeto de estudio va a ser utilizado en un amplio rango de concentración, la precisión del analito se estimará en varios niveles de

concentración, normalmente bajo, medio y alto. Se recomienda que se repitan las estimaciones de precisión, parcial o totalmente, durante el trabajo de validación.

5 Seguimiento

Cuando un método validado/verificado se introduce en el uso rutinario de un laboratorio, es importante que un analista competente sea hecho responsable de la supervisión y seguimiento del mismo para comprobar que se ejecuta continuamente en correspondencia con los resultados obtenidos en la validación/verificación. Debajo se muestra un ejemplo de directrices sobre cómo debe efectuarse este seguimiento.

5.1 Seguimiento continuo

Deben supervisarse continuamente la veracidad y la precisión del método. Los resultados obtenidos deben estar de acuerdo con los resultados de la validación o verificación. La frecuencia con que ese control se debe efectuar, se determinará por el analista responsable y debe quedar totalmente documentado, por ejemplo en los manuales de usuarios analíticos internos. Ver también el Procedimiento NMKL No. 3 (1996).

5.2 Supervisión para seguir los cambios en el procedimiento

Los cambios en las condiciones experimentales de un método pueden causar una modificación de la función del método. En tales casos, puede ser necesario efectuar nuevamente una validación completa.

Modificaciones menores del método: Si el método ha sido modificado en mayor o menor extensión, debe asegurarse que después de la modificación, suministre iguales o mejores resultados en cuanto al límite de detección, la especificidad, la veracidad y la precisión para todas las matrices apropiadas.

Uso de nueva matriz: Si el método va a ser utilizado en una matriz que no fue incluida en la validación o verificación, la utilidad de la nueva matriz debe ser asegurada verificando la especificidad, la veracidad y la precisión.

Nuevos reactivos: Si se van a utilizar reactivos de un nuevo fabricante, o se esperan grandes variaciones del lote, debe verificarse que el límite de detección y la sensibilidad permanezcan inalteradas.

Nuevos instrumentos: Cuando se introducen nuevos instrumentos en uso, debe verificarse el rango de medición, la linealidad, el límite de la cuantificación y la precisión.

Nuevas premisas: Si se establecen nuevas premisas para el análisis y consecuentemente se comienzan a utilizar nuevos analitos, matrices e instrumentos, debe verificarse el blanco, el límite de cuantificación, la linealidad y la precisión.

Nuevo analista: Si un nuevo analista comienza a trabajar con un método, debe asegurarse que la persona en cuestión está suficientemente bien preparada para la tarea. Esto puede hacerse verificando el límite de cuantificación, la veracidad y la precisión.

El método no se ha utilizado durante mucho tiempo: Si el método no se ha utilizado durante mucho tiempo, debe verificarse el límite de cuantificación, la veracidad y la precisión.

6 Ejemplo de validación completa de un método interno

Este capítulo describe cómo hacer una validación completa de un método interno. El ejemplo utilizado es un nuevo método desarrollado para la determinación de vitamina C (ácido ascórbico). El principio del método es la extracción, cromatografía HPLC con par iónico en una columna C18, y detección UV. Se propone el método para que sea aplicable a todos los tipos de alimentos y suplementos dietéticos, y se espera que rinda el mismo nivel de resultados que un método más antiguo. El método se ha desarrollado íntegramente en un laboratorio. Por consiguiente, es necesario realizar una validación completa de este método interno.

6.1 Especificidad (descrito en 3.2)

Se efectúa una comparación entre un método nuevo y uno viejo en 23 alimentos que incluyen todas las matrices apropiadas. No se observa la interferencia de ningún pico en el cromatograma de HPLC para ninguno de los alimentos. Los resultados se dan en la tabla de abajo. Los cálculos se efectúan en una hoja de Excel y está disponible en el Anexo 1, que puede ser descargado del sitio web www.nmkl.org bajo el nombre de "Descarga Hoja de Cálculo Excel".

Tabla 6.1 — Resultados para vitamina C analizada por un método nuevo y uno viejo, respectivamente

Vitamina C en alimentos y suplementos dietéticos mg/100 g

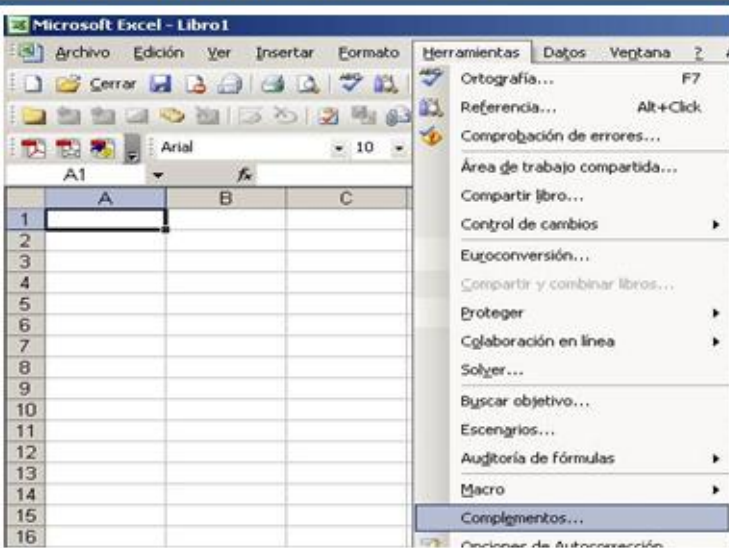
Muestra	Método viejo	Método nuevo	Media	Diferencia	Dif. relativa
			$(91+86)/2$ =	$(91-86) =$	$(5 \cdot 100)/88.5$
1	91	86	88.5	5	= 5.65
2	55	59	57	-4	-7.02
3	16	16	16	0	0.00
4	12	15	13.5	-3	-22.22
5	41	43	42	-2	-4.76
6	54	60	57	-6	-10.53
7	27	29	28	-2	-7.14
8	35	41	38	-6	-15.79
9	55	57	56	-2	-3.57
10	55	56	55.5	-1	-1.80
11	28	27	27.5	1	3.64
12	25	25	25	0	0.00
13	54	53	53.5	1	1.87
14	25	19	22	6	27.27
15	7.3	8	7.65	-0.7	-9.15
16	63	55	59	8	13.56
17	58	57	57.5	1	1.74
18	58	58	58	0	0.00
19	58	57	57.5	1	1.74
20	56	62	59	-6	-10.17
21	66	64	65	2	3.08
22	93	96	94.5	-3	-3.17
23	46	50	48	-4	-8.33
Media de la diferencia				-0.64	-1.96
Desviación típica				3.66	9.92

Para conocer si hay diferencias significativas entre los resultados del método viejo y el nuevo (columnas sombreadas en la tabla 6.1) se puede utilizar una prueba-t pareada.

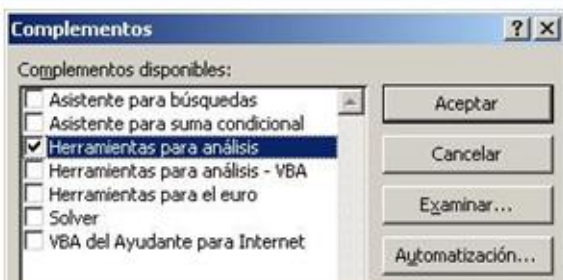
Las Figuras 6.1 y 6.2 muestran cómo utilizar Excel (versión 2003 y 2007), para evaluar los datos.

Figura 6.1 Cómo utilizar las herramientas estadísticas en Excel 2003.

1. En Menú seleccione Herramientas y luego Complementos



2. Marque Herramientas para análisis y presione Aceptar



3. En Menú seleccione Herramientas y luego Análisis de Datos... al final

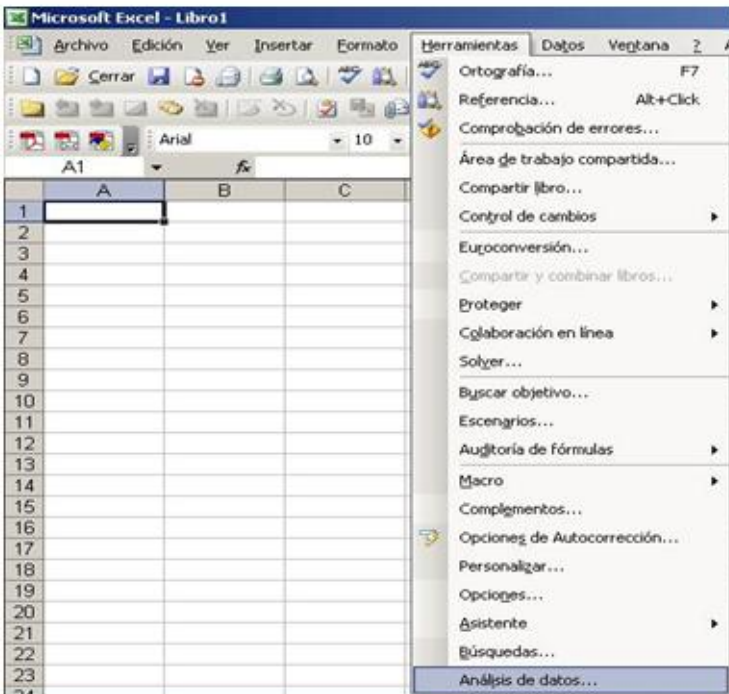



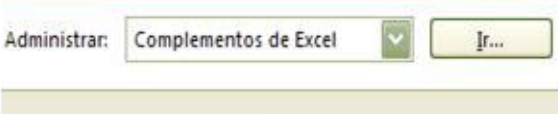
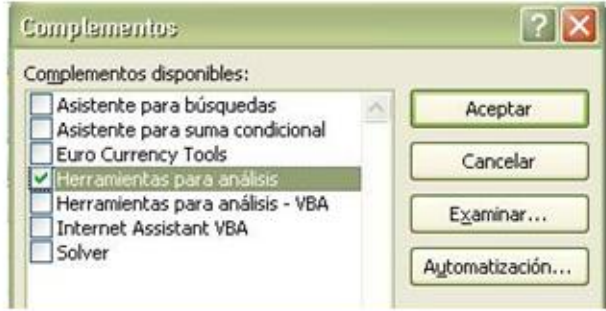

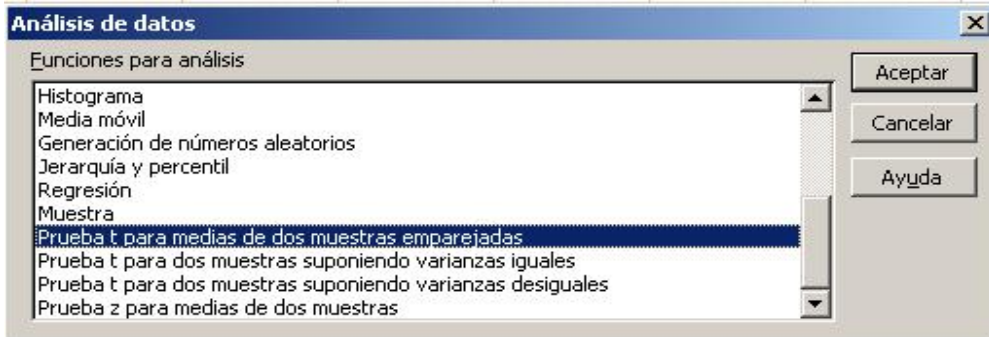


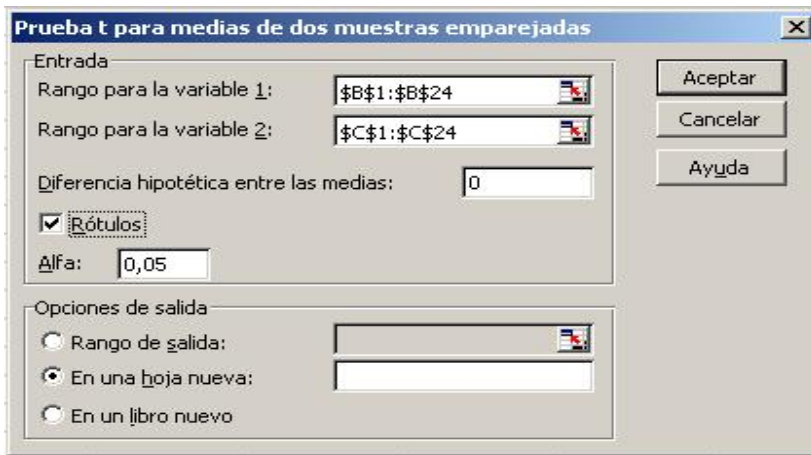
Figura 6.2: Cómo utilizar las herramientas estadísticas en Excel 2007.

<p>1. Presione la tecla de Office</p>	
<p>2. Seleccione Opciones de Excel abajo en la ventana</p>	
<p>3. Seleccione Complementos</p>	
<p>4. Seleccione Complementos de Excel en la lista Administrar, presione Ir...</p>	
<p>5. Marque Herramientas para análisis y presione Aceptar</p>	
<p>6. Si selecciona el menú Datos, entonces aparece en el extremo derecho Análisis de Datos</p>	

Entonces despliegue el menú análisis de datos para la "prueba-T: medias pareadas de dos muestras", como se presenta a continuación



Escoja la columna mostrada en la tabla 6.1 para los métodos viejos como variable 1 y el resultado para el nuevo método como la variable 2. Plantée la diferencia media como hipótesis nula.

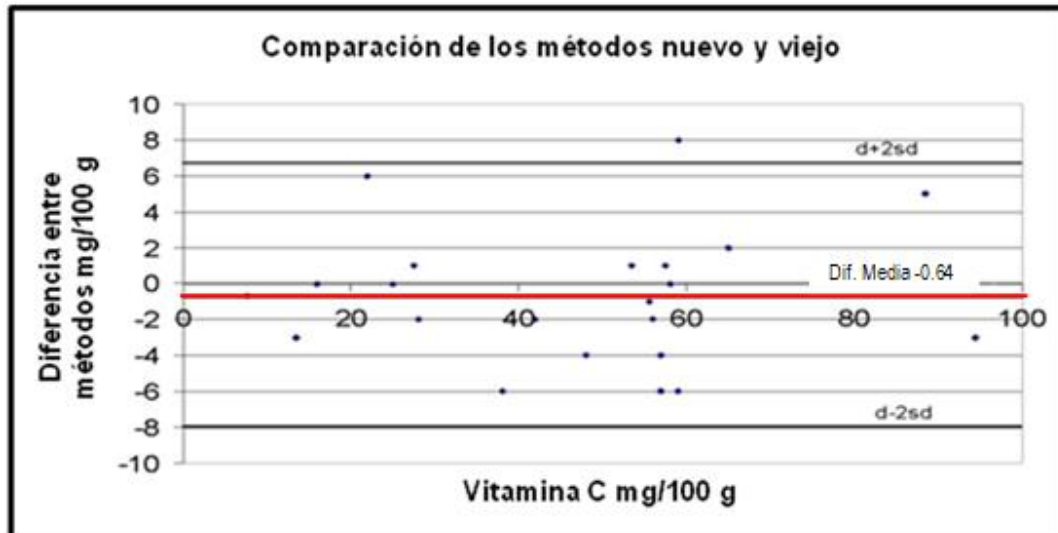


Entonces automáticamente obtendrá una tabla similar a la de abajo. (Observe que las cifras decimales dadas no corresponden con la exactitud de los métodos).

Prueba-T: Media para dos rangos pareados:

	<i>Método viejo</i>	<i>Método nuevo</i>
Media (promedio de result. de 23 muestras)	46.8826087	47.52173913
Varianza	503.3987747	495.6245059
Número de observaciones	23	23
Correlación de Pearson	0.98660336	
Hipótesis de la diferencia de la media	0	
Grados de libertad, GL	22	
Estadístico-t	-0.836920087	
P(T≤t) una cola	0.20581841	
t-crítica una cola	1.717144187	
P(T≤t) dos colas	0.411636821	
t-crítica dos colas	2.073875294	

Los resultados de las pruebas-t muestran que no hay diferencia estadística entre los resultados [T? t]. Se ha planteado la diferencia entre los dos métodos contra el contenido promedio para verificar si hay una correlación sistemática (ver la siguiente figura).



No se observa ninguna correlación entre la diferencia y el contenido. Todos los puntos, excepto uno (en la figura anterior) están dentro de ± 2 sd. Un requisito previo para calcular los números absolutos, es que el contenido sea aproximadamente el mismo en todos los pares de muestras. Realmente no es el caso de este ejemplo, por consiguiente, el cálculo de la diferencia relativa entre los resultados de los dos métodos es más correcto.

Para la diferencia relativa, el intervalo de confianza de 95 % viene dado por:

$$\frac{2 \times 9,91}{\sqrt{22}} \% = 4,22\%$$

El resultado de estos cálculos, es una diferencia media de -1,96% con una desviación típica de 9,92 y un intervalo de confianza de 95% para una diferencia media de 4,22. Esto significa que la diferencia, $-1,96\% \pm 4,22\%$, no es significativamente diferente de 0, y por consiguiente, los métodos no producen resultados significativamente diferentes.

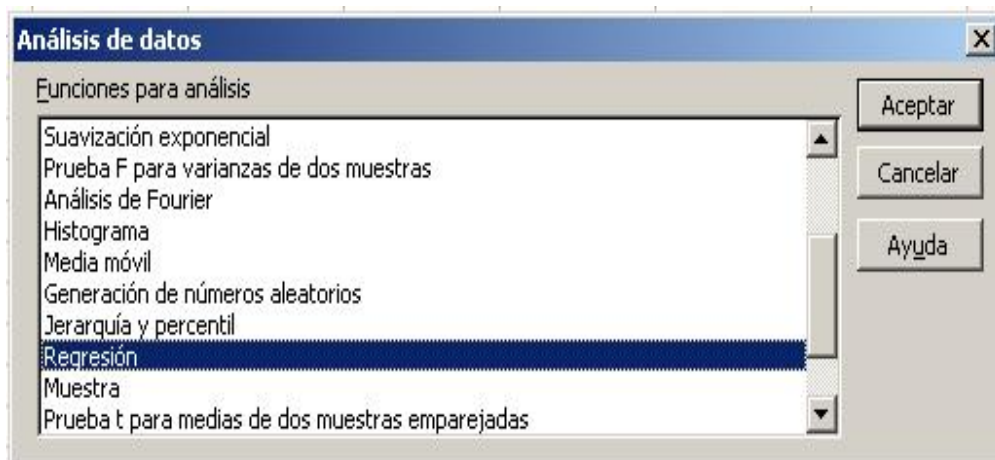
6.2. Curva patrón (descrito en 3.3)

La curva patrón debe cubrir el rango completo de concentración pertinente con al menos 5 - 6 puntos. Cada solución patrón debe inyectarse por lo menos dos veces, con un total de 2 repeticiones. En este caso, el rango de concentración pertinente va desde 2.5 a 100 μg vitamina C/ml, y se han preparado 6 soluciones patrones. La tabla que sigue contiene las concentraciones pertinentes, las áreas, la diferencia entre los paralelos y el cuadrado de la diferencia. Además se ha efectuado un análisis de regresión, que se presenta más adelante. Para la hoja de cálculo de Excel, vea el Anexo 2 en www.nmkl.org bajo el título "Descarga de la Hoja de Cálculo de Excel".

Tabla 6.2 — Curva patrón

µg/ml	Área	a-b	(a-b) ²
2.5	92023	131	17161
2.5	91892		
5	187248	1122	1258884
5	186126		
10	357074	1325	1755625
10	355749		
25	915327	-2564	6574096
25	917891		
50	1807727	-	2066793444
50	1853189	45462	
100	3604581	-	1084714225
100	3637516	32935	
Suma			3161113435
s ₂ ²			263426119,6

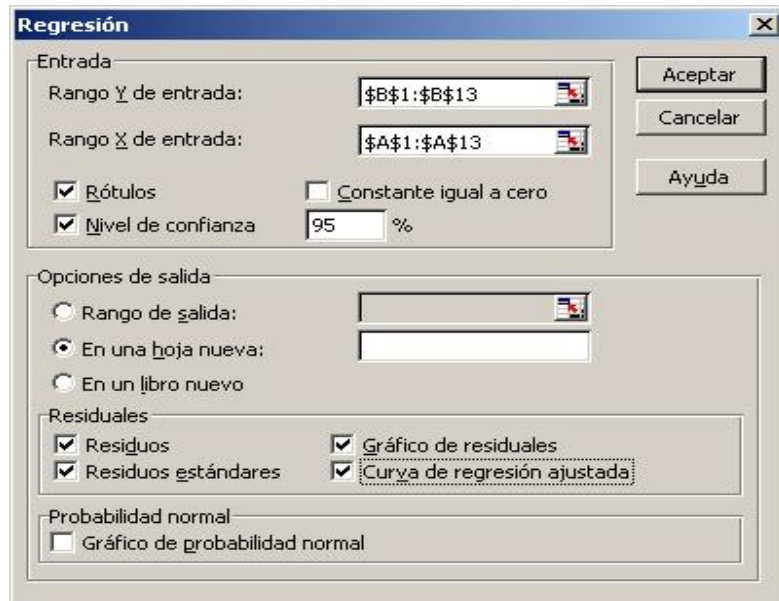
Para hacer un análisis de regresión en Excel, vea la figura 6.1 ó 6.2 dependiendo de la versión. Se selecciona Análisis de datos, Regresión.



Presionando Aceptar aparece lo siguiente:

En el rango-Y se colocan las áreas (incluso la celda con el texto "Área") y en el rango-X se coloca la concentración (incluso la celda con el texto "µg/ml"). Entonces se selecciona:

- ✓ Rótulos
- ✓ Residuos
- ✓ Gráfico de residuales
- ✓ Nivel de confianza
- ✓ Residuos estándares
- ✓ Curva de regresión ajustada



Entonces aparecerán automáticamente calculados los datos y las cifras presentados en la tabla que sigue a continuación.

Resumen (Estadística de la Regresión)

R Múltiple 0.999935545
R-cuadrado 0.999871093
R-cuadrado ajustado 0.999858203
Error estándar 15484.22775
Observaciones 12

Análisis de Varianza
 ANOVA

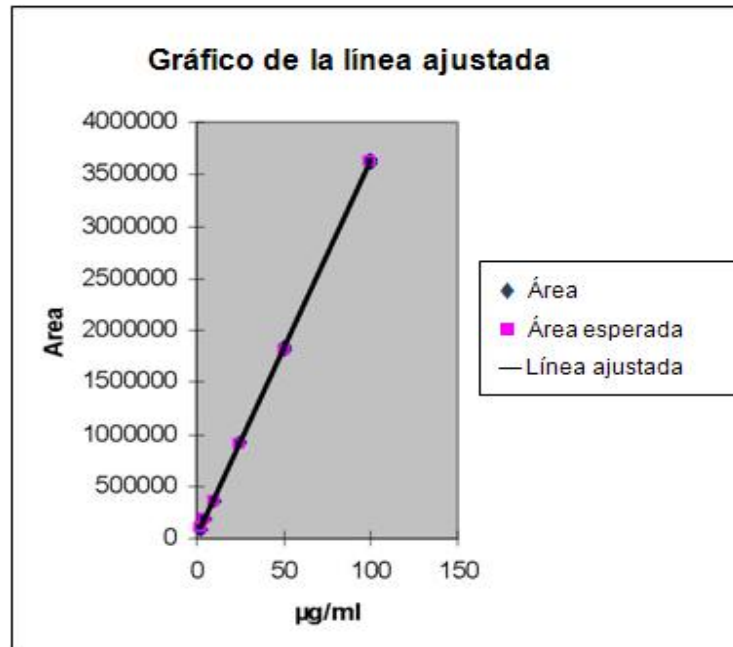
	GL	SC	CM	F	Significación de F
<i>Regresión</i>	1	1.86E+13	1.8597E+13	77565.49	8.75995E-21
<i>Residual</i>	10	2.398E+0	239761309		
<i>s</i>		9			
<i>Total</i>	11	1.86E+13			

	<i>Coefficientes</i>	<i>Error estándar</i>	<i>Estad-t</i>	<i>Valor-P</i>	<i>Inferior 95%</i>	<i>Superior 95%</i>
<i>Intercepto</i>	4501.670443	6116.2644	0.73601632	0.47863	-9126.21827	18129.56
<i>µg/ml</i>	36239.79988	130.12224	278.505808	8.76E-21	35949.8694	36529.73

Hay una correlación altamente significativa entre el área y la concentración. $R^2 = 0,99979$. El coeficiente de la pendiente = 36240 y el intercepto en el eje-Y = 4502.

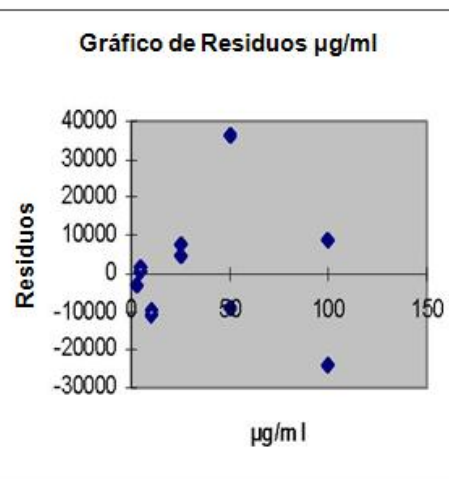
Se calculó el intervalo de confianza para el intercepto, que incluye 0,0; lo que significa que la

curva patrón pasa a través de 0,0.



Se ha planteado el residuo contra la concentración (la diferencia entre el valor-Y observado y esperado).

SALIDA - RESIDUOS			
Observación	Área esperada	Residuos	Res-cuadrado
1	95101.17015	-3078.17	9475131.46
2	95101.17015	-3209.17	10298773
3	185700.6699	1547.3301	2394230.58
4	185700.6699	425.33015	180905.733
5	366899.6693	-9825.669	96543776.5
6	366899.6693	-11150.67	124337425
7	910496.6675	4830.3325	23332112.1
8	910496.6675	7394.3325	54676153.1
9	1816491.665	-8764.665	76819344.8
10	1816491.665	36697.335	1346694429
11	3628481.659	-23900.66	571241485
12	3628481.659	9034.3413	81619323.2
Suma			2397613089
S_1^2			239761309



La figura muestra que los puntos están distribuidos al azar alrededor del eje-X que indica que la curva realmente es lineal. Si los puntos se desvían, bien hacia arriba o hacia abajo, significa que el ajuste puede ser, de hecho, un polinomio de segundo grado.

La linealidad también puede probarse según Tiley:

$$s_1^2 = \frac{1}{n-2} \sum (y - \hat{y})^2 = \frac{1}{10} \times 2397613089 = 239761309$$

$$s_2^2 = \frac{1}{n-1} \sum (y - \bar{y})^2$$

Donde se han efectuado n determinaciones repetidas al mismo nivel de concentración, preferentemente en la zona central de la curva patrón, o con el mismo número de repeticiones para todos los puntos (en este caso 2 repeticiones), es posible resumir todos los puntos de la curva patrón:

$$s_2^2 = \frac{1}{2n} \sum (a - b)^2 = \frac{1}{2 \times 6} \times 3161113435 = 263426119,6$$

Donde a-b es la diferencia entre las dos repeticiones, y n es el número de puntos de la curva, es decir 6.

$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2} = \frac{239761309}{263426119,6} = 0,91$$

Con 10 y 6 grados de libertad. $F_{\text{crítica}} (p=0,05) = 4,06$

De esta manera, la correlación es lineal.

6.3. Precisión (descrito en 3.4)

La desviación típica de la repetibilidad del método (s_r) y la desviación típica de la reproducibilidad (s_R) pueden calcularse de varias maneras. Aquí, hemos seleccionado para la demostración, el llamado modelo de análisis de varianza para calcular la reproducibilidad interna y la repetibilidad del método durante la validación.

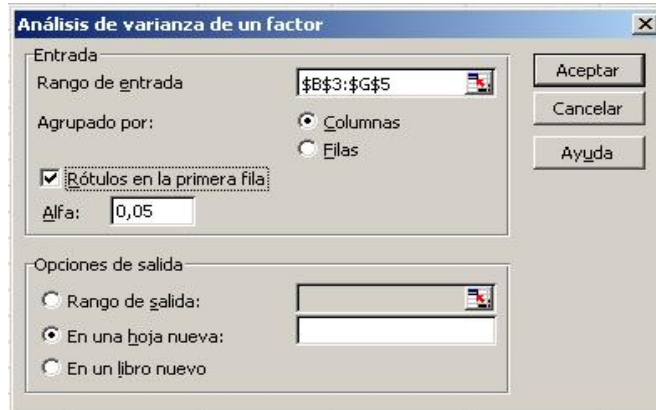
El contenido de vitamina C en cierto alimento, se analiza en 3-6 días diferentes, en este caso 6 días, con un adecuado número de repeticiones cada día, en este caso 2 repeticiones.

**Tabla 6.3 — Resultados de 2 réplicas analizadas durante 6 días.
Vitamina C en un vegetal mg/100 g.**

Vitamina C	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6
Réplica 1	59.00	54.50	52.12	53.43	54.70	55.42
Réplica 2	58.64	52.00	52.32	53.00	58.46	57.93

Seleccione Excel: Análisis de datos, Análisis de Varianza / Anova: un factor. Marque "Agrupado por columnas" y "Rótulos en primera fila".

El análisis de varianza siguiente está disponible en www.nmkl.org: Hoja de cálculo de Excel bajo el título "Descargar hoja de cálculo de Excel" y calcula s_r (dentro de los grupos) y s_d (entre los grupos).



VARIANZA / ANOVA: Un factor

Resumen

Grupos	Número	Suma	Media	Varianza
Día 1	2	117.64	58.82	0.0648
Día 2	2	106.5	53.25	3.125
Día 3	2	104.44	52.22	0.0200
Día 4	2	106.43	53.22	0.09245
Día 5	2	113.16	56.58	7.0688
Día 6	2	113.35	56.68	3.1501

55.13

ANOVA

Fuente de variación	SC	GL	CM	F	Valor-P	F crítica
Entre grupos	67.55057	5	13.5101133	5.995125	0.024927	4.387374
Dentro de grupos	13.5211	6	2.25351667			
En total	81.07167	11				

Los cálculos muestran que hay una diferencia significativa entre los días. [$F > F_{crítica}$].

Entonces la conexión entre la reproducibilidad interna y la repetibilidad es:

$$s_R^2 = s_r^2 + s_d^2 \quad \text{Donde } s_L \text{ es la desviación típica entre días,}$$

$$s_d^2 = \frac{s_d^2 - s_r^2}{n} \quad \text{Donde } s_d \text{ es la desviación típica media,}$$

$$s_d^2 = \frac{1}{p-1} \sum_1^p n(\bar{y} - \bar{y}_m)^2$$

Donde p es el número de días, n es el número de réplicas, \bar{y} es la media por día, y \bar{y}_m es la media de todos los días.

$$s_L^2 = \frac{s_d^2 - s_r^2}{n} = \frac{13,5101133 - 2,25351667}{2} = 5,628$$

$$s_R^2 = s_r^2 + s_L^2 = 2,254 + 5,628 = 7,882$$

$$s_R = \sqrt{7,882} = 2,81 \quad \text{es decir } 2,81 \text{ mg}/100\text{g} \Rightarrow 5,09\%$$

$$s_r = \sqrt{2,254} = 1,50 \quad \text{es decir } 1,50 \text{ mg}/100\text{g} \Rightarrow 2,72\%$$

Además, s_R se calcula como 5.09% y s_r como 2.72%. La repetibilidad normalmente cae entre $\frac{1}{2}$ y $\frac{2}{3}$ del valor de la reproducibilidad interna. En este análisis, s_r representa el 53% de s_R .

Otro método incluye el cálculo de la repetibilidad o la reproducibilidad interna basados en las cartas R (ver NMKL Procedimiento No. 3). Las cartas R se utilizan para registrar la diferencia en el tiempo entre determinaciones dobles. Si las determinaciones dobles se realizan el mismo día, la carta R puede utilizarse para calcular s_r , mientras que si las determinaciones dobles se realizan en días diferentes, la carta R puede utilizarse para calcular s_R . Normalmente, una carta R se conserva para cada matriz pertinente, y por lo menos se exigen 6 puntos para comenzar los cálculos. A continuación se muestra cómo se comienza una carta R para el contenido de vitamina C en un vegetal.

Vitamina C mg/100g. Duplicados realizados en diferentes días

Análisis	Réplicas		Diferencia	Dif. cuad.
1	60.3	57.37	2.93	8.5849
2	55.11	51.6	3.51	12.3201
3	50.74	53.2	-2.46	6.0516
4	51.03	53.82	-2.79	7.7841
5	54.3	58.24	-3.94	15.5236
6	54.0	57.7	-3.7	13.69
Suma				63.9543

Media 54.78417

$$s_R = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - y_i)^2}{2n}} = \sqrt{\frac{27,5387}{12}} = 2,31 \quad \text{es decir, } 2,31 \text{ mg}/100 \text{ g ó } 4,21\%$$

La reproducibilidad interna s_R se calcula como 4.21%, esto es muy próximo al primer método de cálculo (5.09%) como puede esperarse, cuando los cálculos no incluyen más resultados.

6.4 Veracidad (descrito en 3.5)

La mejor manera de determinar la veracidad de un método, es utilizando materiales de referencia certificados (ver Procedimiento No. 9 de NMKL sobre el uso de materiales de referencia). En este caso se dispone de 2 materiales de referencia: Col de Bruselas con un contenido declarado en el

certificado de 439 mg/100 g, y Leche en Polvo con un contenido declarado en el certificado de 76,9 mg/100 g. Se realizaron 7 análisis a la Col de Bruselas con un promedio hallado de 432 mg/100 g y una desviación típica de 22 mg/100 g, y 8 análisis a la Leche en Polvo con un promedio hallado de 74.0 mg/100 g y una desviación típica de 4.0 mg/100 g. Estos resultados fueron comparados con los valores certificados mediante una prueba-t.

Col de Bruselas:

$$t = \frac{(x_{\text{cert}} - x_{\text{hallada}})\sqrt{n}}{s} = \frac{(439 - 432)\sqrt{7}}{22} = 0.84$$

$t_{\text{crítica}}(0,05; 6)$ es decir $p=0.05$ con 6 grados de libertad = 2.45

Leche en Polvo:

$$t = \frac{(76,9 - 74,0)\sqrt{8}}{4,0} = 2,05$$

$t_{\text{crítica}}(0,05;7)$ es decir $p=0,05$ con 7 grados de libertad = 2.37

Como $t < t_{\text{crítica}}$ no hay diferencia significativa entre los contenidos certificados y los resultados observados.

También es posible comparar los resultados obtenidos con otro método validado, como el descrito en 6.1, para determinar la especificidad del nuevo método.

Y finalmente, existe la opción de participar en programas de ensayos de aptitud. En este caso, el contenido de vitamina C se determina para 5 matrices.

Programa de EA para vitamina C

Matriz	Nª de labs	Obtenido	Referencia	Tolerancia	Valor-Z
		<i>Vitamina C mg/100 g</i>			
<i>¿Alimentación diaria? Døgnkost</i>	21	14.2	14.9	4.5	-0.94
<i>Alimento para bebés</i>	23	82.4	82.6	24.8	-0.05
<i>Fórmula infantil</i>	20	63.7	65.0	19.5	-0.40
<i>Fórmula infantil</i>	21	81.8	83.0	24.9	-0.29
<i>Leche en polvo</i>	24	42.7	44.9	13.5	-0.98

Se utiliza en los cálculos una desviación típica de 5%.

$$\text{Valor Z} = \frac{x_{\text{Obtenida}} - x_{\text{referencia}}}{s_{\text{abs}}}$$

En programas de EA, como en este caso (Bipea), calcule los límites de tolerancia y no el valor-z, cada laboratorio puede calcular el valor-z con su propia reproducibilidad interna, en este caso 5%,

puesto que los límites de tolerancia son generalmente tan anchos que los resultados caen siempre dentro de ellos. La propia reproducibilidad del laboratorio es normalmente más baja que la desviación típica que puede calcularse a partir del programa de ensayo de aptitud. Utilizar la reproducibilidad interna del laboratorio es, por consiguiente, una prueba más severa de la veracidad del método. El valor-z debe ser menor de 2, este requisito se tiene que cumplir para todas las matrices.

De esta manera se han obtenido resultados satisfactorios en los tres ensayos sobre la veracidad del método.

Si un laboratorio no tiene el acceso a un material de referencia certificado, y no puede comparar los resultados con otro método o participar en programas de EA, la conducción de ensayos de recuperación sería la única manera de determinar la veracidad del método. En un ensayo de recuperación, una cantidad conocida de vitamina C equivalente a la cantidad ya presente en la muestra, se agrega a la misma:

$$\text{Recuperación} = \frac{m_{\text{hallada}} - m_{\text{original}}}{m_{\text{añadida}}}$$

Donde:

m_{hallada} es la cantidad de vitamina C medida la cual consiste en la cantidad original medida,

m_{original} , más la cantidad añadida conocida, $m_{\text{añadida}}$. En este caso, se han realizado 14 ensayos de adición en varias matrices y los resultados se han registrado en una carta-X. Los resultados siguientes fueron informados:

- √ Promedio de la recuperación: 99%
- √ Desviación típica de la recuperación: 4,6%
- √ ($\pm 2s$); intervalo de confianza de 95%: desde 90 a 108%.

Por consiguiente, el intervalo de confianza incluye 100%.

Este ensayo de recuperación utiliza una curva patrón y se corresponde con la llamada "recuperación aparente". Las fórmulas para el cálculo de la recuperación y la "recuperación aparente" son idénticas, sin embargo el término "recuperación aparente" incluye la situación ideal de que una curva patrón pudiera tener otra intersección con el eje-y y otra pendiente diferente a la de la curva patrón del material de referencia. Si eso sucede, el porcentaje de recuperación sólo sería correcto para la concentración donde las curvas se intercepten entre ellas. Ésa es una situación ideal que apenas ocurre en la vida real. Por lo menos éste es el caso de este ejemplo, donde los resultados obtenidos de los ensayos de recuperación en diferentes matrices no se desvían significativamente del 100% como promedio.

6.5 Rango de medición (descrito en el Capítulo 3.6)

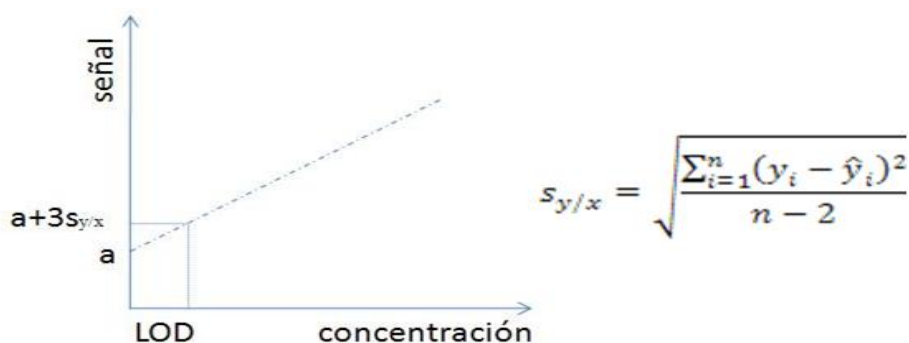
Un rango de medición realista para este método va desde 2.5 μg a 100 μg por 100 ml, el cual debe ser cubierto por la curva patrón. Si hay alguna concentración fuera de este rango, hay dos

opciones: Extender la validación para incluir un rango de medición más amplio, o preparar la muestra con una cantidad de la misma y una dilución que aseguren que la concentración final de la solución inyectada caiga dentro del rango de la curva patrón.

El rango de medición es normalmente determinado en base al contenido del analito en las matrices pertinentes, las cantidades prácticas de muestra y las diluciones, de manera que el rango de medición no se halle próximo al límite de cuantificación. Un rango de medición de dos a cinco veces el límite de cuantificación resulta satisfactorio.

6.6 Limite de detección (descrito en 3.7)

Una manera común de calcular el límite de detección, es realizar más de 20 análisis de una muestra sin ningún o con muy bajo contenido de vitamina C, y calcular la desviación típica de los blancos o del bajo contenido. El límite de detección se define entonces como 3s (3 veces la desviación típica). Para los métodos cromatográficos no existe a menudo el valor del blanco, y por consiguiente es necesario aumentar el ruido de la línea de fondo, medir la amplitud del ruido a intervalos de 1 minuto por lo menos 10 veces, y luego calcular la desviación típica de estas mediciones. También es posible utilizar la curva de calibración como se muestra a continuación.



La desviación típica de la curva de calibración ya se halla calculada en el capítulo 6.2 así como la ecuación para la línea:

Intercepto = $a = 4501$

Coefficiente de la pendiente ($\mu\text{g/ml}$) = 36240

$$s_1^2 = s_{y/x}^2 = 239761309 \quad \delta \quad s_1 = 15484$$

$$a + 3s_1 = 4502 + 3 \times 15484 = 50954$$

Cuando tenemos un valor de la señal podemos calcular la concentración utilizando la ecuación de una línea recta, $y=a+bx$, así:

$$x = \frac{y - a}{b}$$

Límite de detección: $(50953 - 4501)/36240 = 3.1 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$

El límite de detección está dos veces por debajo del límite inferior del rango de medición, lo cual es satisfactorio.

6.7 Limite de cuantificación (descrito en 3.8)

El límite de cuantificación se define a menudo como 10s, el cual en este caso significaría 4,3 µg/100 ml. Sin embargo, aquí el laboratorio ha realmente escogido utilizar una concentración de 2.5 µg/100 ml como la concentración más baja en la curva patrón. Esto ha demostrado que funciona perfectamente en la práctica, aunque es mucho más bajo que la concentración que corresponde a 10s.

A menudo el límite de cuantificación también se define como 6s, lo que está de acuerdo con este ejemplo. No deben utilizarse reglas demasiado rígidas para el límite de cuantificación y deben ser evaluadas para cada caso.

6.8 Robustez (descrito en 3.9)

Hay muchos factores en el método de análisis que pueden influir potencialmente en el resultado del análisis. Una manera de examinar la robustez consiste en variar los niveles de todos los posibles factores de mayor a menor. Tales factores pueden incluir el pH en la extracción, el tiempo de extracción, la temperatura, la cantidad de fluido extraído, la temperatura de la columna, la velocidad de flujo, etc. Si cada uno de estos 6 factores se examina en dos niveles diferentes, es necesario efectuar un total de $2^6 = 64$ determinaciones, sin contar las repeticiones. Esto permitirá la estimación de todos los efectos principales y la de los efectos de interacción. Sin embargo, debido a que la realización de tantas determinaciones no es muy práctico, se utiliza con frecuencia a cambio un plan factorial fraccionado. Un modelo simple para esto se describe en la Decisión de la Comisión 2002/657/EC del 12 de agosto de 2002 implementado por el Consejo Directivo 96/23/EC. En este modelo, se estima el efecto de 7 factores empleando sólo 8 determinaciones.

A continuación, se examinan 3 factores con sólo 4 determinaciones:

- A. Fluido de elución: pH 3,75 ó 3,65.
- B. Temperatura de la columna: 50 ó 40 °C.
- C. Temperatura del buffer de extracción: 35 ó 30 °C.

Una tabla conteniendo las determinaciones, aparecería así:

Factor valor	Combinación de determinaciones			
	1	2	3	4
A/a	A	A	a	a
B/b	B	b	B	b
C/c	C	c	c	C
Resultado	D	E	F	G

El promedio se calcula en base a la diferencia entre los resultados de los factores en los niveles alto y bajo:

$$D_a = \frac{D + E}{2} - \frac{F + G}{2} \quad D_b = \frac{D + F}{2} - \frac{E + G}{2} \quad D_c = \frac{D + G}{2} - \frac{E + F}{2}$$

Si la diferencia es mayor que ($2s_r$), el efecto del factor es estadísticamente significativo al nivel de confianza de 95%.

El resultado de la prueba de robustez del método de vitamina C se presenta a continuación.

Resultados de la Vitamina C en mg/100 g para las 4 combinaciones:

Factor	Combinaciones			
	1	2	3	4
<i>pH</i>	3.75	3.75	3.65	3.65
<i>Temperatura de la columna</i>	50	40	50	40
<i>Temperatura del buffer</i>	35	30	30	35
<i>Resultado</i>	54.6	52.3	55.9	51.4

$$D_{pH} = \frac{(54,6 + 52,3)}{2} - \frac{(55,9 + 51,4)}{2} = -0,2$$

$$D_{temp\ columna} = \frac{(54,6 + 55,9)}{2} - \frac{(52,3 + 51,4)}{2} = 3,4$$

$$D_{temp\ buffer} = \frac{(54,6 + 51,4)}{2} - \frac{(52,3 + 55,9)}{2} = -1,1$$

Si los factores influyen en los resultados, la diferencia obtenida debe ser mayor que $2s_r$. En el apartado 6.3 se ha estimado la desviación típica de la repetibilidad, s_r , como $s_r = 2.72\% = 1.46$ mg/100g.

Como " $D_{temp\ columna}$ " es mayor que $2s_r$, la temperatura de la columna es significativa, ya que una temperatura de 50°C produce resultados significativamente más elevados que la temperatura de 40°C. Los otros dos factores no son importantes.

Idealmente, la temperatura de la columna se debe variar aún más, por ejemplo, realizando las determinaciones con temperaturas de columna de 50 °C y 60 °C para asegurar que el análisis se efectúe dentro del rango óptimo de temperatura.

7 Lista de palabras

La lista 1 contiene explicaciones sobre algunos términos y expresiones que se utilizan en el texto. Una explicación más detallada de los términos puede hallarse en el texto principal, en el capítulo 3. La lista 2 contiene algunos términos que a menudo son causa de confusión entre los idiomas escandinavos.

Lista 1:

Término	Explicación
Limite de determinación	Menor cantidad de analito que puede ser determinada con una confianza exactamente definida
Limite de detección	Menor cantidad de analito que puede ser detectada con una aceptable significación estadística.
Sensibilidad	Limite aplicable del rango de concentración para el método
Recuperación	Diferencia entre los resultados de medición de una muestra sin analito y una muestra con una cantidad conocida de analito añadido, dividida entre la cantidad de analito añadido
Estudio colaborativo (Estudio de desempeño de método)	Ensayo de participación sobre las habilidades de los laboratorios para obtener resultados satisfactorios sobre un método analítico objeto de evaluación. Los laboratorios son instruidos para seguir fielmente la descripción del método.
Rango de concentración	Intervalo de concentración donde se aplica el método
Limite de Cuantificación	Menor cantidad de analito que puede ser determinada cuantitativamente con una confianza exactamente definida (igual a $10s$, donde s es la desviación típica del valor promedio del blanco)
Rango de medición	Intervalo de validación del método con aceptables resultados de veracidad y precisión
Precisión	Grado de concordancia entre resultados de análisis independientes obtenidos bajo condiciones específicas
Veracidad	Grado de concordancia entre el contenido verdadero de un analito específico en una muestra y el resultado del análisis
Robustez	Habilidad para producir resultados de medición aceptables ante desviaciones menores del procedimiento

Término	Explicación
Ensayo de aptitud	Un ensayo sobre la competencia en la ejecución de un análisis específico por los laboratorios participantes. Los laboratorios no son provistos con la descripción detallada del método, sino que pueden utilizar sus propios métodos de rutina y adaptaciones.
Especificidad	Habilidad de un método analítico para distinguir el analito objeto de determinación de otras sustancia presentes en la muestra
Desviación típica	Medida de la dispersión de resultados simples alrededor del valor medio: $s = \sqrt{\frac{\sum(x - \bar{x})^2}{n - 1}}$
Validación	Determinación de los parámetros de un método, como rango de trabajo, veracidad, precisión, límite de cuantificación y valor HorRat
Verificación	Ensayo que evidencia si un laboratorio individual puede realizar los análisis de acuerdo con los requisitos establecidos en la validación

Bibliografía

- 1 Duncan Thorburn Burns, Klaus Danzer, Alan Townshend (2002) Uso de los términos "recuperación" y "recuperación aparente" en los procedimientos analíticos. Pure & Applied Chemistry 74 2201-2205.
- 2 Norman Richard Draper, Harry I Smith (1981) Aplicación del Análisis de Regresión. Nueva York, John Wiley & Sons. ISBN 0-471-02995-5.
- 3 William Horwitz (1995) Protocolo para el Diseño, Comportamiento e Interpretación de Estudios de Desempeño de Métodos. Pure & Applied Chemistry 67 331-343.
- 4 Harald Martens, Tormod Næs (1989) Calibración Multivariada. Chichester: John Wiley & Sons. ISBN 0 471 90979 3.
- 5 W D Pocklington (1990) Protocolos armonizados para la adopción de métodos analíticos normalizados y para la Presentación de sus características de desempeño. Pure & Applied Chemistry 62 149-162.
- 6 E H Steiner (1975) Planificación y Análisis de Resultados de Ensayos Colaborativos. I: W J Youden, E H Steiner,,: Manual estadístico de la Asociación de Químicos Analíticos Oficiales. Washington: AOAC.
- 7 Michael Thomson, Stephen L R Ellison, Roger Wood (2002) Directrices Armonizadas para la Validación de Métodos de Análisis en un único Laboratorio. Pure & Applied Chemistry 74 835-855.
- 8 Michael Thompson, Roger Wood (1993) Protocolo Internacional Armonizado sobre Ensayos de Aptitud en Laboratorios de Análisis (Químico). Pure & Applied Chemistry 65 2133-2144.
- 9 Michael Thompson, Roger Wood (1995) Protocolo Armonizado para el Control Interno de la Calidad en Laboratorios de Análisis Químico. Pure & Applied Chemistry 67 649-666.
- 10 P F Tiley (1985) El mal uso de los coeficientes de correlación. Chemistry in Britain 162-163.

De organizaciones:

- 11 UE (1985) Consejo Directivo del 20 de Diciembre de 1985 sobre la introducción de métodos comunitarios de muestreo y análisis en el control de alimentos destinados al consumo humano (85/591/CEE) OJ N° L372/50-52.
- 12 UE (2001) Comisión Directiva 2001/22/CE de 8 de Marzo del 2001 que establece los métodos de muestreo y de análisis para el control oficial de los niveles de plomo, cadmio, mercurio y 3-MCPD en alimentos. OJ N° L 77/14, 16.3.2001, corregido por la Decisión de la Comisión del 4 de Diciembre del 2001 subsanando la Directiva 2001/22/CE estableciendo los métodos de muestreo y análisis para el control oficial de los niveles de plomo, cadmio, mercurio y 3-MCPD en alimentos. OJ N° L 325/34, 8.12.2001.

- 13 Eurachem (1996) Validación de Método - Guía de Laboratorio, Versión 1.0,
- 14 Eurachem (1998) Aptitud para el Propósito de Métodos Analíticos. Guía de Laboratorio para la Validación de Métodos y Temas Relacionados. Versión 1.0.
- 15 ISO/IEC Guía 43 (1996) Desarrollo y Funcionamiento de Ensayos de Aptitud de Laboratorio.
- 16 ISO 5725 (1994-1998) Exactitud (veracidad y precisión) de los resultados y métodos de medición.

Parte 1: Principios generales y definiciones (1994, corregida en 1998). (NC-ISO 5725:2005)
Parte 2: Método básico para la determinación de la repetibilidad y de la reproducibilidad de un método de medición normalizado (1994, corregida en 2002).
Parte 3: Mediciones intermedias de la precisión de un método de medición normalizado (1994, corregida en 2001).
Parte 4: Métodos básicos para la determinación de la justeza de un método de medición normalizado (1994).
Parte 5: Métodos alternativos para la determinación de la precisión de un método de medición normalizado (1998).
Parte 6: Utilización práctica de valores de exactitud (1994, corregida en 2001).
- 17 NC ISO/IEC 17025 (2006) Requisitos Generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración + Corrigendum Técnico 1:2006.
- 18 NMKL Procedimiento N° 3 (1996) Cartas de control y materiales de control en el control interno de la calidad en laboratorios químicos de alimentos.
- 19 NMKL Procedimiento N° 9 (2007) Evaluación de resultados derivados del análisis de Materiales de Referencia Certificados.
- 20 NMKL Informe N° 8 (1997) Directrices para el aseguramiento de la calidad en los laboratorios químicos de alimentos (sólo en idiomas sueco y finlandés), 2ª edición.
- 21 NMKL Informe N° 11 (2001) Evaluación de métodos analíticos químicos en NMKL - Directrices para árbitros (sólo en idiomas escandinavos). 2ª edición.
- 22 NORDTEST Proyecto 1143-93 (1996) Directrices nórdicas para el análisis químico de muestras de suelo contaminadas.

Anexo 1: Pruebas-t

Hay 3 tipos diferentes de pruebas-t. Se presupone que las mediciones x_1, x_2, \dots, x_n y y_1, y_2, \dots, y_m son independientes y normalmente distribuidas con una desviación típica σ y expectativas μ_x y μ_y , respectivamente. En la práctica, las pruebas se llevan a cabo por medio de un programa estadístico; las pruebas-t son una función estándar en todos los programas estadísticos generales. Si tales programas no están disponibles, las pruebas pueden llevarse a cabo "manualmente" comparando T con c en la tabla del Anexo 2.

1. Prueba-t simple

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

Calcule el valor medio

¿Puede asegurarse que μ_x esperada sea significativamente diferente de un valor especificado μ_0 ? Como ejemplo, μ_0 puede ser el valor de un material de referencia especificado. La prueba consistiría en: Rechazar la hipótesis de que $\mu_x = \mu_0$ y afirmar que $\mu_x \neq \mu_0$ si el valor positivo de T es mayor que c, donde

$$T = \frac{\bar{x} - \mu_0}{s} \sqrt{n}$$

y c es el fractil $(1-\alpha/2)$ en la distribución-T con $(n-1)$ grados de libertad.

2. Prueba-t doble

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i \quad \text{y} \quad \bar{y} = \frac{1}{m} \sum_{j=1}^m y_j$$

Calcule los valores medios

¿Puede asegurarse que μ_x sea significativamente diferente de μ_y ? La prueba consistiría en: Rechazar la hipótesis de que $\mu_x = \mu_y$ y afirmar que $\mu_x \neq \mu_y$ si el valor positivo de T es mayor que c, donde

$$T = \frac{\bar{x} - \bar{y}}{s' \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{1}{m}}}$$

$$s' = \sqrt{\frac{1}{m+n-2} \left((n-1)s_x^2 + (m-1)s_y^2 \right)}$$

y s_x y s_y son las desviaciones típicas para las x's y las y's, respectivamente, y c es el fractil $(1-\alpha/2)$ en la distribución-T con $(m+n-2)$ grados de libertad.

3. Prueba-t pareada

Las x's y las y's aparecen pareadas. Calcule $z_i = x_i - y_i$, y utilice una prueba-t simple para las z's. Con el objetivo de probar si $\mu_x = \mu_y$, pruebe si $\mu_z = \mu_0 = 0$ como se ha descrito anteriormente en la sección 1.

Anexo 2: Tabla para las Pruebas-t

La tabla declara los valores c tales que hay una probabilidad p por una unidad distribuida-t con los grados de libertad dados (GL) siendo menores o iguales a c . Los valores han sido calculados utilizando la función TIF en el programa estadístico SYSTAT (versión 6.0 para DOS).

GL	p=0,75	p=0,90	p=0,95	p=0,975	p=0,99	p=0,995
1	1.0000	3.0777	6.3138	12.7062	31.8205	63.6567
2	0.8165	1.8856	2.9200	4.3027	6.9646	9.9248
3	0.7649	1.6377	2.3534	3.1824	4.5407	5.8409
4	0.7407	1.5332	2.1318	2.7764	3.7469	4.6041
5	0.7267	1.4759	2.0150	2.5706	3.3649	4.0321
6	0.7176	1.4398	1.9432	2.4469	3.1427	3.7074
7	0.7111	1.4149	1.8946	2.3646	2.9980	3.4995
8	0.7064	1.3968	1.8595	2.3060	2.8965	3.3554
9	0.7027	1.3830	1.8331	2.2622	2.8214	3.2498
10	0.6998	1.3722	1.8125	2.2281	2.7638	3.1693
11	0.6974	1.3634	1.7959	2.2010	2.7181	3.1058
12	0.6955	1.3562	1.7823	2.1788	2.6810	3.0545
13	0.6938	1.3502	1.7709	2.1604	2.6503	3.0123
14	0.6924	1.3450	1.7613	2.1448	2.6245	2.9768
15	0.6912	1.3406	1.7531	2.1314	2.6025	2.9467
16	0.6901	1.3368	1.7459	2.1199	2.5835	2.9208
17	0.6892	1.3334	1.7396	2.1098	2.5669	2.8982
18	0.6884	1.3304	1.7341	2.1009	2.5524	2.8784
19	0.6876	1.3277	1.7291	2.0930	2.5395	2.8609
20	0.6870	1.3253	1.7247	2.0860	2.5280	2.8453
25	0.6844	1.3163	1.7081	2.0595	2.4851	2.7874
30	0.6828	1.3104	1.6973	2.0423	2.4573	2.7500
35	0.6816	1.3062	1.6896	2.0301	2.4377	2.7238
40	0.6807	1.3031	1.6839	2.0211	2.4233	2.7045
45	0.6800	1.3006	1.6794	2.0141	2.4121	2.6896
50	0.6794	1.2987	1.6759	2.0086	2.4033	2.6778
60	0.6786	1.2958	1.6706	2.0003	2.3901	2.6603
70	0.6780	1.2938	1.6669	1.9944	2.3808	2.6479
80	0.6776	1.2922	1.6641	1.9901	2.3739	2.6387
90	0.6772	1.2910	1.6620	1.9867	2.3685	2.6316
100	0.6770	1.2901	1.6602	1.9840	2.3642	2.6259
150	0.6761	1.2872	1.6551	1.9759	2.3515	2.6090
200	0.6757	1.2858	1.6525	1.9719	2.3451	2.6006
300	0.6753	1.2844	1.6499	1.9679	2.3388	2.5923
400	0.6751	1.2837	1.6487	1.9659	2.3357	2.5882
500	0.6750	1.2832	1.6479	1.9647	2.3338	2.5857
600	0.6749	1.2830	1.6474	1.9639	2.3326	2.5840
700	0.6748	1.2828	1.6470	1.9634	2.3317	2.5829
800	0.6748	1.2826	1.6468	1.9629	2.3310	2.5820
900	0.6748	1.2825	1.6465	1.9626	2.3305	2.5813
1000	0.6747	1.2824	1.6464	1.9623	2.3301	2.5808
10000	0.6745	1.2816	1.6450	1.9602	2.3267	2.5763