

10530

8



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

“CALIDAD EN LAS ORGANIZACIONES
(EMPRESAS E INSTITUCIONES DE PRODUCCIÓN
Y DE SERVICIOS) VALIDACIÓN DE MÉTODOS
ANALÍTICOS COMO PARTE DE UN SISTEMA
DE ADMINISTRACIÓN DE CALIDAD”

TRABAJO DE SEMINARIO

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

LICENCIADO EN QUIMICA INDUSTRIAL

P R E S E N T A :

JUAN ROLANDO VAZQUEZ MIRANDA

ASESOR: DRA. FRIDA MARIA LEÓN RODRÍGUEZ

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEXICO

2002

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
PRESENTE

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 51 del Reglamento de Exámenes Profesionales de la FES-Cuautitlán, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el Trabajo de Seminario:

Calidad en las Organizaciones (Empresas e Instituciones
de Producción y de Servicios)
Validación de métodos analíticos como parte de un sistema
de administración de calidad.
que presenta el pasante: Juan Rolando Vazquez Miranda
con número de cuenta: 9756494-0 para obtener el título de :
Licenciado en Química Industrial

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXÁMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VISTO BUENO.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 13 de Septiembre de 2001.

MODULO	PROFESOR.	FIRMA
<u>I</u>	<u>Dra. Frida María León Rodríguez</u>	<u>Frida León</u>
<u>II</u>	<u>Inq. Juan Rafael Garibay Bermúdez</u>	<u>J. Garibay</u>
<u>III</u>	<u>Dr. Armando Aguilar Márquez</u>	<u>Armando Aguilar</u>

Gracias a Dios

Gracias a mis padres y a toda mi familia que siempre me apoyaron

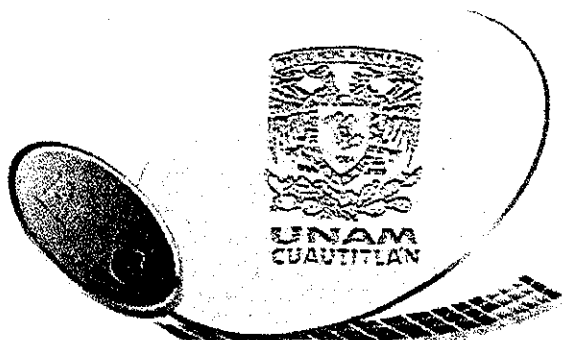
Gracias a todos mis amigos por su apoyo y por todos los buenos ratos

Gracias a todos mis profesores.

*Gracias a la MÁXIMA casa de estudios
La UNAM.*



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN



*“CALIDAD EN LAS ORGANIZACIONES
(EMPRESAS E INSTITUCIONES DE PRODUCCIÓN
Y DE SERVICIOS)”*

***VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS
COMO PARTE DE UN
SISTEMA DE ADMINISTRACIÓN DE CALIDAD***

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

INDICE

1. INTRODUCCION	1
1.1 Objetivos.....	2
1.2 Introducción al Aseguramiento de Calidad en un Laboratorio.....	3
1.3 validación como parte Fundamental de un Sistema de Aseguramiento de Calidad.....	3
1.4 Requerimientos del Cliente y el Analista.....	4
1.5 Importancia del Análisis Químico.....	5
2. BUENAS PRACTICAS DE LABORATORIO DE ANÁLISIS QUÍMICO	5
2.1 Antes de Iniciar un Análisis.....	5
2.2 Durante el Análisis.....	6
2.3 Después del Análisis	7
2.4 Reporte.....	8
3. GUIAS DOCUMENTADAS Y PROCEDIMIENTOS ESCRITOS	9
3.1 Fichas Técnicas para el Análisis de un Producto.....	10
3.2 Protocolos para la Redacción y Validación de Boletines de Análisis Químicos	
3.2.1 Redacción de un Boletín de Análisis.....	10
3.2.2 Validación de un Boletín de Análisis.....	11
3.3 Documentos escritos según la AOAC International.....	12
4. TRAMITES METODOLOGICOS EN EL ANÁLISIS QUÍMICO	15
4.1 Elección de un Método de Análisis.	
4.1.1 Según Propósito de Análisis.	
4.1.2 Según Contexto de Análisis.....	16

4.1.3	Según Características Fisicoquímicas.	
4.2	Fuentes de Métodos de Análisis.....	17
5.	DESARROLLO Y OPTIMIZACIÓN DE UN METODO DE ANÁLISIS QUÍMICO	19
5.1	Métodos y Técnicas	
5.2	Desarrollo de un Método Analítico	
5.3	Optimización de un Método Analítico.....	20
6.	VALIDACIÓN DE METODOS ANALÍTICOS	22
6.1	Antecedentes.	
6.2	Errores en el Análisis Químico.....	23
6.2.1	Distribución de Errores.....	24
6.2.2	Limites de Confianza de la Media.....	25
6.2.3	Pruebas de Significación.....	26
6.3	Validación y Criterios de Confiabilidad.....	27
6.4	Exactitud y Precisión.	
6.4.1	Exactitud.	
6.4.2	Evaluación de la Exactitud.....	28
6.4.3	Comparación con un Método Convencionalmente Exacto.....	32
6.4.4	Precisión.....	33
6.4.5	Evaluación de la Precisión.	
6.4.7	Criterios de Aceptación en Análisis Farmacéutico.....	37
6.4.8	Análisis de varianza y reproducibilidad.....	38
6.4.9	Comparaciones Múltiples en ANOVA de dos Factores.....	43
6.4.10	Cuadrados Latinos.....	47
6.5	Métodos de Calibración y Linealidad	49
6.5.1	Linealidad.....	50
6.5.2	Errores en la Pendiente y la Ordenada.....	53

6.5.3 Rango (Intervalo).....	54
6.5.4 Uso de Rectas para comparar Métodos Analíticos.....	55
6.5.5 Regresión no Lineal y Linealización.....	56
6.6 Patrones de Calibración Externa.....	57
6.7 Calibración externa en relación a una Curva de Calibración	
6.8 Sensibilidad y Limite de Detección.....	58
6.8.1 Estudio de la Sensibilidad.....	59
6.8.2 Limite de Detección.	
6.8.3 Limite de Cuantificación.....	61
6.9 Robustez y Desigualdad (Robustness and Ruggedness).....	62
6.10 Criterios de Rechazo.....	65
6.11 Especificidad y Selectividad.....	67
6.12 Rendimiento de una Extracción.....	68
6.13 Comparación de algunos Métodos de Validación.....	69
6.14 Soluciones estándar y reactivos de referencia.....	72
6.14.1 Precisión y Estabilidad de Soluciones.....	73
6.14.2 Recomendaciones para Calibrar Soluciones.....	74
6.15 Muestreo.....	76
6.16 Graficas de Control.....	78
7. CURVAS DE CALIBRACION.....	83
7.1 Análisis Instrumental.	
7.2 Curvas de Calibración Directas e Indirectas.....	84
7.3 Curvas de Adiciones Patrón Directas e Indirectas.....	87
7.4 Curvas de Valoración.....	88
8. PROGRAMA DE VALIDACIÓN.....	94
8.1 Programa de Validación (in- house Validation)	
8.2 Programa Zero-Blind.	

8.3 Programa Single-Blind.....	95
8.4 Programa Double-Blind.....	
8.5 A 8.7 Validación a través de Estudios Interlaboratorios según la AOAC.....	
8.8 Validación por análisis de Estándares de Referencia.....	98
8.9 Validación por comparación con un Método Aceptado.....	
8.10Revalidación.....	99
9. ASPECTOS LEGALES Y NORMATVOS.....	100
9.1 Acreditación.....	100
9.2 Estándares de Calidad.....	
9.3 Requerimientos de la GLP.....	102
9.4 Requerimientos de la NAMAS.....	103
9.5 Auditorías de Calidad.....	105
9.6 Normas mexicanas de Control de Calidad.....	
9.7 Acreditación de laboratorios de pruebas.....	106
10. Conclusiones.....	112
11. Bibliografía.....	113
12. Anexos.....	115

Nota: todas las figuras, graficas y tablas están enumeradas por capitulo, iniciando con el numero del capitulo.

Las ecuaciones están entre paréntesis en negrita y también se encuentran enumeradas por capitulo.



CAPITULO 1

1. INTRODUCCION

Debido a la gran evolución y desarrollo que ha tenido la industria química muy pronto se necesito para determinados compuestos y productos, el establecimiento de un seguimiento de sus especificaciones, como parte de un sistema de aseguramiento de calidad. Por ello el análisis cuantitativo y cualitativo de cierto numero de productos químicos forma parte de las prescripciones clásicas en una industria y es complemento necesario de un examen fisicoquímico.

La puesta en marcha de estos tipos de estudios exige una validación de los métodos aplicados.

Esta exigencia de validación es una practica común en el campo industrial donde cualquier método nuevo descrito en un expediente debe ir acompañado de una validación completa.

Por tanto parece justificado encarar el problema de la validación de una técnica, como un paso común de todos los técnicos, cualquiera que sea la especificidad.

La validación de un método analítico puede definirse como un paso critico cuyo propósito es asegurar su calidad o validez. El objetivo de la validación no es comparar un método con otro ya existente (método de referencia) si no conocer mejor sus características.

La validación corresponde a un estudio científico de los criterios de confiabilidad de una técnica analítica estos son:

- la exactitud
- la precisión
- la sensibilidad
- el limite de detección
- la especificidad y selectividad
- la linealidad

- el rendimiento (en casos en los que se requiera)
- repetibilidad
- reproducibilidad.

Estos criterios son específicos de una técnica en condiciones definidas. La apreciación de las cualidades del método se define en relación a un compuesto, un método y un equipo dado.

En este trabajo se da una descripción general de los métodos y programas de validación obtenidos a partir de una investigación bibliográfica. La forma en que esta organizada la información, así como algunos comentarios y contenidos son originales.

La principal aportación de este trabajo es que constituye una recopilación completa de los métodos de validación, tratados en forma didáctica de tal forma que sean útiles para organizaciones productivas e instituciones académicas.

1.1 OBJETIVOS

2. El objetivo principal de este trabajo es establecer una guía metodológica para la implementación de un proceso de validación de métodos analíticos, como parte del sistema de administración de calidad en laboratorios, estableciendo los criterios generales para su correcta aplicación.
3. Dar una descripción general de los principios con los que tiene relación la validación, tales como el sistema de calidad del laboratorio, teniendo en cuenta que no se trata de un manual de calidad.
4. Establecer los criterios mínimos para la validación de un método analítico.
5. Dar una descripción breve de los principales organismos normativos en relación a la validación y sistemas de calidad de los laboratorios de análisis químico.
6. Comparar los protocolos de validación de diversos organismos privados y gubernamentales.
7. Contar con una guía que pueda unificar criterios entre profesionistas, técnicos y académicos que tienen bajo su cargo esta responsabilidad en centros de enseñanza o en la industria, con objeto de hacer más productivo el trabajo de todas las personas que están involucradas en este tipo de actividades

1.2 INTRODUCCION AL ASEGURAMIENTO DE CALIDAD EN UN LABORATORIO

Informes de debates y decisiones en importantes temas como el daño de la capa de ozono, lluvia ácida y la calidad del agua de los canales, todos dependen de datos provistos por químicos analíticos. Evidencias forenses frecuentemente dependen de mediciones químicas. Marcas nacionales e internacionales son críticamente dependientes de resultados analíticos, como composición química y de acuerdo a esto clasificados en determinada fracción arancelaria. En todas estas áreas la importancia del aseguramiento de la calidad en la determinación de resultados analíticos puede no tener tanto énfasis.⁽¹¹⁾

El costo de la falta de calidad puede ser enorme:

- En análisis forense esto puede llevar a tomar decisiones completamente erróneas.
- En las marcas comerciales esto puede ocasionar un suministro de un producto inadecuado y el alto costo de remplazamiento a la subsecuente pérdida de clientes.
- En el suministro de agua esto puede llevar al consumo de agua contaminada.
- En todas las áreas de aplicación esto puede llevar a la pérdida de validez de los resultados analíticos, ocasionando repeticiones de análisis y por consiguiente pérdidas económicas. Esto sin contar la reputación del laboratorio.

1.3 VALIDACION COMO PARTE DE UN SISTEMA DE ASEGURAMIENTO DE CALIDAD

Puede haber alguna confusión con lo que queremos decir con calidad. Una de las definiciones de calidad en el diccionario: es el grado de excelencia que posee un objeto. Sin embargo en química analítica nosotros necesitamos ampliar esta definición, justo como en el caso de juzgar la calidad en relación a la vida diaria. Como juzgamos la calidad de un Rolls Royce, un Mazda MX5 o un Volkswagen todos estos son carros los cuales tienen excelencia y una buena reputación, pero la cantidad de dinero requerido para comprarlos es muy diferente. Cual comprarías dependiendo de para que lo quieras no comprarías un Rolls Royce para trabajo pesado porque no cumpliría tus expectativas, sin embargo un Volkswagen si con esto queremos decir que ambos son de calidad, pero cada uno satisface ciertos requisitos.⁽¹¹⁾

La calidad en el laboratorio es todo lo que provee resultados como:

- Satisfacer las necesidades específicas del cliente.
- Dar confianza al cliente y a todos los que hagan uso de esos resultados.
- Representa valor en dinero.

Se pregunta como realizar un análisis, que factores considerar para obtener un resultado de calidad. Se debe considerar lo siguiente:

- Precisa el conocimiento de las necesidades del cliente; es esto el contenido total de azúcares o la cantidad de lactosa presente es la requerida.
- Que nivel de incertidumbre es aceptable.
- Método de muestreo correcto; la muestra es representativa.
- Método analítico apropiado; hay alguna posibilidad de error.
- Procedimiento experimental registrado; puede alguien reproducirlo en el futuro.
- Reporte al cliente; este es entendible y da respuesta a las preguntas del cliente.

Si se considera lo anterior se estará haciendo lo correcto, sin embargo la calidad no solamente depende de eso, también se debe considerar lo siguiente:

- Mantenimiento de equipo según especificaciones
- Apropiada metodología para registrar los resultados
- Asegúrese de que los resultados son confiables y correctos.

1.4 REQUERIMIENTOS DEL CLIENTE Y EL ANALISTA

Se debe recordar que un cliente quien es miembro del laboratorio es justamente tan importante como el primero fuera de la organización.

Desde luego siempre se deben hacer todas las mediciones usando las mejores habilidades. Sin embargo un valor con alto nivel de precisión no siempre es requerido. Lo mejor es que el resultado producido deba ser bastante preciso y exacto para ser usado por el cliente para el propósito que lo requiera. Los clientes pueden requerir los detalles técnicos del método usado aunque no siempre ocurre así. Por lo tanto es vital que los requerimientos exactos sean discutidos con el cliente antes del análisis. El cliente requerirá suficiente evidencia para tener confianza en los datos. ⁽¹¹⁾

**BUENAS PRACTICAS DE LABORATORIO DE ANÁLISIS QUÍMICO.**

Algunas industrias disponen de un laboratorio de control ya sea para análisis de materia prima o de producto terminado. El establecimiento de recomendaciones referentes a las buenas practicas de laboratorio de análisis tienen como propósito garantizar la calidad y la integridad de los resultados obtenidos. Comúnmente los fascículos de las buenas practicas de laboratorio están integradas en las guías de las buenas practicas de fabricación. En otro capitulo analizaremos con detalle todos los requerimientos de las diferentes organizaciones gubernamentales respecto a este tema.

Buenas practicas de laboratorio, es un termino usado para describir como los químicos y científicos deben ir día a día en su trabajo. Esto incluye todos los temas como seguridad, orden, limpieza, cuidado, atención, organización y disciplina personal. Un químico que tiene estas cualidades y usa estos términos, es mas probable que obtenga buenos resultados y en el menor tiempo a diferencia de quienes no los tienen.

2.1 ANTES DE INICIAR UN ANÁLISIS

Suponiendo que nos damos a la tarea de iniciar un análisis de un conjunto de muestras, usando un método particular previamente validado. No debemos apresurarnos en el trabajo y debemos planear lo que necesitaremos para hacerlo y cuando y como deberemos hacerlo. Como ejercicio se realizara una lista de todos los puntos que se deben considerar antes de iniciar el trabajo con las muestras. Lo que se debe incluir en la lista es lo siguiente:

- a) Localizar las muestras (en el caso de que halla que muestrear revisar la sección de muestreo)
- b) Asegurarse de que la información de métodos este disponible (en caso de que ya hallas elegido el método)

- c) Leer el método si no se está completamente familiarizado con él.
- d) Revisar que toda la instrumentación necesaria esté libre para el período en que trabajarás con ella.
- e) Planear la secuencia de trabajo y lo que se requiere para cada paso. Revisar si algunos pasos son críticos y si el método de análisis puede ser completado después de algún tiempo o días. La complejidad del método puede limitar el número de muestras que pueden ser manejadas conjuntamente.
- f) Realizar un itinerario de plan de trabajo.
- g) Considerar algunos peligros asociados con el método y con el uso de algunos reactivos en particular. Considera algunos factores que puedan afectar tus resultados tales como contaminantes de trabajos pasados. El trabajo solo puede ser iniciado si se cuenta con todas las medidas de seguridad.
- h) Si se va a hacer un análisis de rutina tal vez no requiera reacondicionar el laboratorio, pero en el caso contrario hay que adecuar nuevamente el laboratorio.
- i) El químico debe contar con todo el equipo de seguridad necesario.
- j) Si se va a trabajar con equipo o material en el que no se tiene un buen entrenamiento probablemente sea necesario contar con supervisión.
- k) Se debe revisar que todo el material de vidrio esté limpio, el equipo calibrado y que se cuente con el material necesario.
- l) Revisar los reactivos, estándares y materiales de referencia que estén en buen estado. En donde los reactivos requieren preparación, esto se tendrá que haber hecho previamente.
- m) Se debe contar con un plan de disposición de material y residuos peligrosos.
- n) Se debe contar también con un plan de mantenimiento y limpieza de equipo.

2.2 DURANTE EL ANÁLISIS

Lo que se puede incluir en la lista de lo que se debe hacer durante el análisis puede ser lo siguiente:

- a) Para cada muestra revisar detalles como condiciones de muestras, referencias cruzadas en tu hoja de trabajo.

- b) Revisar que las muestras están a la temperatura correcta antes de abrir sus contenedores.
- c) Llevar a cabo procedimientos de muestreo apropiados asegurándose que todas las alícuotas están bien etiquetadas, identificar el paso anterior y el siguiente en el análisis.
- d) Donde el equipo es usado varias veces para diferentes muestras asegúrese de que se lave adecuadamente después de cada muestra.
- e) A menos que el método indique otra cosa, la secuencia correcta para seguirlo es hacer primero la calibración apropiada. Si la calibración es satisfactoria, entonces se llevara un control de calidad adecuado. Donde las muestras son examinadas en conjunto se debe hacer calibración periódica y control de variables periódicamente.
- f) Seguir el método exactamente como esta escrito. Si el método ha sido escrito correctamente este indicara la forma en que se hacen las cosas. No tomar atajos esto solo ocasionaría problemas y necesidad de repetir el método.
- g) No trabajar demasiado a prisa, esto podría ocasionar errores. Si se planea apropiadamente no se debe tener necesidad de apresurarse.
- h) Registrar las observaciones, datos y detalles inusuales claramente de acuerdo con las recomendaciones en la sección de reportes.

2.3 DESPUÉS DEL ANÁLISIS

Algunos puntos que debe incluir la lista son:

- a) Usando los datos recopilados, hacer los cálculos pertinentes, buscar errores comparar si se obtuvieron los resultados esperados o no.
- b) Revisa las transcripciones y cálculos principalmente si las hizo alguna otra persona. Esto puede ser necesario si estas en un grupo de análisis o trabajas con otra persona.
- c) Las muestras deben ser retenidas hasta que el reporte haya sido hecho satisfactoriamente. Las muestras pueden ser retenidas por un periodo de tiempo largo.
- d) El área de laboratorio usada para el trabajo debe ser completamente limpiada y los reactivos y materiales deben ser guardados.

2.4 REPORTE

Una vez que han sido producidos los resultados y de haberles hecho alguna manipulación será necesario tenerlos listos para presentarlos al cliente o persona adecuada. Al reportar el analista puede tener una gran cantidad de información, pero este debe procesarla para obtener un resultado final. Todos los cálculos, correcciones en curvas de calibración etc, deberán ser procesados para obtener información específica. Es importante que alguna persona diferente del analista revise otra vez los cálculos y los datos y así finalmente los resultados deben ser expresados de la forma correcta ya sea con números o gráficos.

Aquí se debe tener extremo cuidado de no tener errores en los datos. Si se tienen errores al hacer el reporte puede traer consecuencias graves. Los cálculos y proceso de reporte se hacen fácilmente si los datos están ordenados de manera clara.

Lo esencial de un buen reporte es que provea la información claramente y sin ambigüedades en una forma en la cual este disponible para el cliente. Un obvio requerimiento es que satisfaga los requerimientos del cliente.



CAPITULO 3

GUIAS DOCUMENTADAS Y PROCEDIMIENTOS ESCRITOS.

Lo mismo que con la fabricación, la función de control debe organizarse alrededor de procedimientos escritos, técnicamente validados, fechados y debidamente aprobados a fin de garantizar la calidad e integridad de los datos obtenidos en el curso de un estudio. Estos procedimientos de operación no se fijan en el tiempo y se adaptan a la evolución de los conocimientos. Sin embargo no hay que olvidar que cuando se modifica cualquier procedimiento, el documento anulado debe archivar.

Puede tratarse de procedimientos mas generales para realizar una operación. El procedimiento describe la lista y la cronología de las actas previstas para esta operación.

En lo que se refiere al equipo las indicaciones siguientes se aplican tanto a material de laboratorio como al material de fabricación.

Los aparatos de medición deben aprobarse cuando se reciben en el servicio para verificar su capacidad de funcionamiento. Deben inspeccionarse, limpiarse, mantenerse, verificarse periódica y convenientemente de acuerdo con los procedimientos escritos. Así es indispensable verificar a diario la exactitud de una balanza o la de un medidor de pH o verificar un osmometro cada vez que se va a utilizar. Cuando existen contratos de mantenimiento con empresas exteriores es necesario archivar los contratos y confirmar que se lleven acabo convenientemente.

El laboratorio debe emitir boletines que recapitulan los resultados de análisis que constituyen la segunda parte de un expediente. En el caso de un archivo de papel, los dos documentos mas importantes son el cuaderno de laboratorio del técnico con los registros (espectros, cromatogramas, etc) y el boletín de análisis donde se registran los resultados de los análisis. Cabe señalar que un archivo informatico es perfectamente aceptable. Se aconseja conservar los archivos diez años.⁽¹⁰⁾

3.1 FICHAS TÉCNICAS PARA EL ANÁLISIS DE UN PRODUCTO.

Las fichas técnicas son documentos que especifican todo el procedimiento a seguir por el técnico para el análisis de un producto. Estas fichas deben contener la mayor cantidad de información sobre el producto a analizar desde propiedades físicas, químicas, procedimiento general de análisis cuantitativo y cualitativo si así lo requiere, todos los reactivos necesarios.

3.2 PROTOCOLOS PARA LA REDACCIÓN Y VALIDACIÓN DE BOLETINES DE ANÁLISIS QUÍMICO.

Los boletines de análisis son documentos que contienen un reporte general de los resultados obtenidos durante el análisis de un producto. Es muy importante que se tenga un control estricto de todos los resultados y reportes obtenidos para poder realizar un boletín de análisis. A continuación se muestra una metodología para la redacción y validación de los boletines.⁽¹⁰⁾

3.2.1 REDACCION DE UN BOLETIN DE ANALISIS

- 1) Los químicos del laboratorio son los encargados de redactar los boletines de análisis.
- 2) Se redactan y luego mecanografían (en hoja blanca) siguiendo un formato bien establecido.
- 3) Rubrica producto: anotar la denominación de la materia prima o del producto. En caso de una materia prima escribir a lado de su nombre la mención “materia prima”
- 4) En el caso de producto terminado, anotar:
 - a) Denominación.
 - b) Características
 - c) Componentes
 - d) Pruebas

- e) Cantidades
- 5) Columna normas de referencia
- a) respectivas paginas.
 - b) Para las especificaciones, pruebas y cantidades, anotar como referencia las normas cifradas, limites de coloración etc.
 - c) Cuando una norma no esta determinada, anotar en curso de determinación
 - d) Si En esta columna se registran las normas de la ficha técnica
 - e) Para la especificación etiquetas: anotar archivos de referencia junto con sus hay suficiente espacio, anotar el valor teórico de esta columna. De otra manera los valores teóricos pueden anotarse en la columna especificaciones
- 6) Columna RESULTADOS
- a) Esta columna la llena la persona que hace los análisis.
 - b) Para facilitar el registro de los resultados, poner una línea de puntos frente a cada especificación.
 - c) Frente a las rubricas cantidades anotar las unidades asentadas en las fichas técnicas (por ejemplo mg/L) o en % para los resultados que se expresan en porcentaje en relación al valor teórico.
- 7) Rubrica edición: asentar el numero de edición del boletín de análisis. Cuando el boletín se redacta por primera vez de acuerdo con este procedimiento anotar edición numero 1 , cuando el boletín se redacta por enésima vez con este procedimiento se anota edición No n.
- 8) A cada boletín de análisis corresponde una ficha técnica validada según los procedimientos escritos. Se debe anotar el numero de ficha técnica.
- 9) Rubrica asentado, anotar la fecha en que se mecanografió el boletín de análisis.
- 10) Las rubricas orden, numero de lote y de control, fecha. Conclusión, visto bueno se llenan después del análisis.

3.2.2 VALIDACION DE UN BOLETÍN DE ANALISIS

- 1) Después de haberlo redactado, mecanografiado y de que lo corrija su redactor, el boletín de análisis (hoja blanca) se somete para su control al químico de validación.

- 2) En comparación con la ficha técnica, este puede solicitar modificaciones o precisiones. En este caso se vuelve a mecanografiar el boletín de análisis.
- 3) Cuando todas las personas que intervienen (ingeniero químico, químico) aprueban el mismo modelo, el boletín de análisis se fotocopia o imprime:
 - a. en hoja anaranjada (un ejemplar)
 - b. en hojas blancas (una decena de ejemplares)
- 4) En la hoja anaranjada se anota la fecha y la firman las diversas personas que intervinieron (fecha y firma originales)
- 5) La decena de ejemplares no se firma: dos hojas se colocan con la hoja anaranjada firmada en una carpeta de plástico, todo se archiva en las fichas técnicas ordex situadas en la oficina. Las demás hojas se colocan en la carpeta ficha técnica.
- 6) En ese momento termina la validación
- 7) En caso de un boletín válido que necesita mecanografiarse de nuevo:
 - a. corregir el número de la edición
 - b. hacer validar de nuevo el boletín

3.2 DOCUMENTOS ESCRITOS SEGÚN LA AOAC INTERNATIONAL

La AOAC (*Association of Official Analytical Chemists (USA)*) Es un organismo normativo dedicado a la excelencia en el desarrollo y validación de métodos analíticos.

La documentación es la evidencia inicialmente escrita o impresa ahora frecuentemente guardada en base de datos que suministra las pruebas que declaramos son correctas o que el trabajo fue hecho axactamnete como se dijo. El mas cuidadoso de los análisis puede ser invalidado si el trabajo analítico y los resultados obtenidos no están propiamente documentados. El grado de documentación requerida depende de el tipo de trabajo realizado siendo concordante con las necesidades del cliente. Una vez que se ha decidido al respecto, se organiza la información de manera correcta.

Los siguientes ejemplos son parte de la información que se debe incluir en la documentación del laboratorio. Esta es una apreciación global de la documentación que debe tener un laboratorio específico.

- Un manual de calidad que detalle el programa de calidad del laboratorio.

- El procedimiento escrito actual, aprobado para cada actividad del laboratorio desde el recibo de la muestra hasta el reporte de los resultados analíticos. Los procedimientos cubren un rango de tópicos tales como métodos analíticos, instrumentación calibración y mantenimiento, control de calidad, seguridad e higiene, mantenimiento y limpieza de material de vidrio etc.
- La documentación demuestra la habilidad de realizar satisfactoriamente cada método usado en el laboratorio. Esto incluye compendios de métodos tales como los de la *Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL*, la *USP* y el *Food Chemicals Codex*. Y el correspondiente compendio oficial que ha sido autorizado por las leyes nacionales. Los compendios desarrollados en el laboratorio requieren un alto nivel de verificación, pero si se cuenta con una documentación de validación completa estos métodos se pueden aplicar sin mayor problema.
- Se requiere documentación que demuestre la realización de chequeos, calibración y rutinas de mantenimiento de cada instrumento usado en el laboratorio.
- Documentos de la validación y aprobación de hojas de calculo generadas por computadora usadas en los cálculos de los resultados analíticos.
- Documentación de estándares de calibración disponibles en fuentes reconocidas.
- Documentación de la recepción y almacén de cada muestra incluyendo condiciones especiales de almacenamiento (como temperatura, humedad, tiempo etc.) debido a que estas condiciones pueden ser criticas para la estabilidad de la muestra
- Documentos de alguna desviación de los procedimientos, justificando las desviaciones en procedimientos escritos que deberán ser aprobadas.
- Ir al corriente con una lista que incluya el nombre de cada persona que esta calificada para seguir los métodos oficiales.
- Registro de la experiencia y habilidades del personal técnico. Este registro incluye experiencia interna y externa y verificación de su trabajo en los métodos y técnicas.
- Para cada corrida analítica un registro detalla el equipo, reactivos, soluciones, estándares de calibración, tiempos y temperaturas criticas, números de muestra, pesos, volúmenes, condiciones cromatograficas especificaciones del instrumento etc. Las entradas deben ser legibles y las correcciones correctamente hechas. El

registro debe proveer suficiente información para permitir la repetición satisfactoria del análisis sobre las condiciones originales.

- Un registro de la mayor cantidad de pasos del análisis tales como: pesadas , digestiones de la muestra, diluciones, etc. Así como el nombre de la persona que los realizo.
- Todas las corridas de análisis de replicas y sus controles y estándares necesitan ser identificados y asociados con un número único de muestra en el laboratorio. Este número debe aparecer en todos los documentos relacionados con la muestra incluyendo rendimiento del instrumento y hojas de trabajo.^(1a)

**TRAMITES METODOLOGICOS EN EL ANÁLISIS QUÍMICO**

La determinación cuantitativa y la identificación de los componentes de un producto o material requieren procedimientos analíticos muy diversos cuya elección no siempre es fácil. Por tanto es necesario antes de establecer o adaptar una técnica analítica mas o menos compleja y onerosa (en tiempo y material), plantear muy bien el problema a resolver⁽¹⁰⁾.

A continuación veremos todas las consideraciones para la elección de un método de análisis.

4.1 ELECCION DE UN METODO DE ANÁLISIS**4.1.1 SEGÚN PROPÓSITO DEL ANÁLISIS**

Antes de iniciar el trabajo con una muestra es necesario saber que pasara con los resultados y que decisiones se deberán tomar dependiendo de los valores numéricos obtenidos.

El propósito de un análisis y de el uso al cual el reporte analítico o certificado se sometería.

Se puede sugerir lo siguiente:

- a) preparación de un banco de datos, figuras para establecer tendencias; por ejemplo cambios en los residuos de pesticidas en alimentos de acuerdo con la estación del año.
- b) Rechazo o aceptación de un producto químico antes de sus uso en un producto manufacturado.
- c) Determinación de las especificaciones de un producto; cumple o no cumple.

Se puede tener a través de un numero u otro de razones validas para realizar el análisis. En la lista anterior las consecuencias de un error en el análisis pueden ser muy fuertes.

Rechazo o aceptación o casos de evaluación pueden costar (o salvar) una compañía de perdidas económicas dependiendo del tipo de error y de la producción afectada.

Ahora es necesario considerar detenidamente cuales serian las consecuencias de un trabajo analítico pobre y como afectarían en el trabajo analítico. Se deben considerar tanto problemas inmediatos, discusiones con la directiva del laboratorio etc.⁽¹¹⁾

4.1.2 SEGUN EL CONTEXTO DEL ANÁLISIS

De manera general, el análisis debe permitir, asegurar con un mínimo de garantía la calidad del producto, en un mínimo de tiempo y al menor costo. No hay que olvidar que el producto fabricado lo fue a partir de materias primas conformes ya sea con monografía oficial (especificaciones) o un pliego de condiciones analíticas muy estrictas. En la medida en que el control de las materias primas sea muy completo, la consecuencia lógica será que el control de los productos terminados sea lo mas sencillo posible y garantice la seguridad de su uso.

4.1.3 SEGÚN CARACTERÍSTICAS FISICOQUÍMICAS

Una vez considerado el punto anterior se eligió reunir en un mismo apartado lo que por experiencia parece estrictamente indisoluble: las características fisicoquímicas de lo que se quiere analizar y las características fisicoquímicas del vehículo asociado.

La elección de el método de análisis indiscutiblemente esta definida por sus propiedades debido a esto mencionaremos algunas de estas a continuación:

- Características acido-base.
- Propiedades de absorción de radiación electromagnética.
- Propiedades oxido-redox.
- Propiedades físicas (punto de fusión, ebullición índice de refracción densidad etc.)

La elección correcta de un método de análisis involucra una gran cantidad de factores desde la disponibilidad de material y equipo, las propiedades fisicoquímicas de las muestras y el costo que es muy importante cuando se trata de minimizar costos. Obviamente las técnicas instrumentales de análisis son las mas costosas a corto plazo, pero se podría pensar a futuro,

talvez invertir en un equipo caro realmente resulte redituable a largo plazo debido a que si comparamos un método de análisis volumétrico por ejemplo que es mas tardado, involucra gasto de reactivo en concentraciones apreciables y un espectrofotometrico requiere menos tiempo de análisis se manejan concentraciones mas bajas, solo se tiene que hacer una curva de valoración y leer todas las muestras en serie. Todo es cuestión de analizar bien los métodos disponibles y ver cual es el mas adecuado. ⁽¹⁰⁾

Y los factores mas importantes que debemos considerar que son los que trataremos a fondo en este trabajo son los parámetros de confiabilidad.

4.2 FUENTES DE MÉTODOS DE ANÁLISIS QUÍMICO

Como ya vimos los métodos analíticos pueden ser a) cualitativos o b) cuantitativos. El primero usualmente no posee tanto problema debido a que comúnmente solo se requiere conocer la presencia de un analito en particular y no implica parámetros estadísticos, únicamente hay que elegir un método lo suficientemente sensible para poder detectarlo. Por otro lado los métodos cuantitativos son usados en una gran cantidad de situaciones y con una gran variedad de métodos que pueden ser usados. Lo que se debe recordar siempre es que el método usado debe estar disponible siempre.

La química analítica es una ciencia tanto teórica como practica y es utilizada en un gran numero de laboratorios de diversas formas. Los métodos de análisis son rutinariamente desarrollados, optimizados, validados, colaborativamente estudiados y aplicados. Existen grandes compilaciones de métodos como la *USP (U.S. Pharmacopeia)*, *EPA Handbook Of Methods for Environmental Pollutants*, *the Oficial Methods of Análisis (Association of Official Analytical Chemists AOAC)* y otras. Técnicas instrumentales son desarrolladas por laboratorios industriales y clínicos para reunir requerimientos regulatorios. El hecho es que los químicos practican la química analítica de una forma u otra mas que cualquier otra área de la química. ⁽¹⁴⁾

Un gran numero de métodos analíticos disponibles que entran en diferentes categorías, se encuentran en las siguientes fuentes:

- a) Métodos desarrollados en el mismo laboratorio para satisfacer las necesidades propias.

- b) Métodos disponibles en la literatura científica; por ejemplo la *Análisis Journal AOAC International*, *Journal of the Association of Public Analysts*, *Journal of Chromatography*.
- c) Métodos suministrados por organizaciones de marca.
- d) Métodos publicados en libros por organizaciones profesionales; por ejemplo *The Royal Society of Chemistry (Analytical Methods Committee)*, *Association of Official Analytical Chemists (USA)*
- e) Métodos de organizaciones de estandarización, por ejemplo (UK) BSI; (International) ISO; (Europe) CEN; (USA) ASTM etc.

Probablemente los métodos con mayor grado de validez son los primeros en la lista, aunque todos los demás fueron desarrollados a base de una gran cantidad de estudios colaborativos. En el campo del análisis de trazas donde los analistas están intentando determinar muy bajos niveles de analitos (ppm, ppb, mg/kg, $\mu\text{g}/\text{kg}$) en matrices muy complejas por ejemplo en alimentos producto de cultivos es frecuentemente necesario examinar un largo numero de muestras usando métodos que pueden tomar desde unos minutos hasta una semana completa. Los métodos muy rápidos son usados para eliminar la mayoría de las muestras que contienen analitos no detectables para que la mayoría de los recursos se dediquen a muestras mas complejas y que requieran material instrumental caro.⁽¹¹⁾

**DESARROLLO Y OPTIMIZACIÓN DE UN METODO DE ANÁLISIS QUÍMICO****5.1 METODOS Y TÉCNICAS**

El método es un procedimiento planeado que se sigue en la actividad científica para descubrir las formas de existencia de los procesos, distinguir las fases de su desarrollo, desentrañar sus enlaces internos y externos, esclarecer sus interacciones con otros procesos, generalizar y profundizar los conocimientos adquiridos de este modo, demostrarlos luego con rigor racional y conseguir después su comprobación en el experimento y con la técnica de su aplicación.

En conclusión una método es un conjunto de reglas que señalan el procedimiento para llevar a cabo una actividad.⁽¹⁰⁾

Una técnica es un procedimiento o un conjunto de procedimientos regulado y provisto de una determinada eficacia.⁽¹²⁾

5.2 DESARROLLO DE UN METODO ANALÍTICO.

Actualmente el desarrollo de un método se basa en uno que se encuentra en la literatura, en el cual puede ser que usen la misma instrumentación o condiciones parecidas.

El desarrollo de un método usualmente requiere, seleccionar los requerimientos del método y decidir que tipo de instrumentación se requerirá y porque. La etapa de desarrollo implica tomar varias decisiones sobre el equipo, reactivos y accesorios que se usaran.

Pero porque desarrollar un método nuevo. Existen muchas razones para hacerlo:

- Puede no existir un método para un determinado analito en alguna muestra.
- Los métodos existentes pueden no ser satisfactorios o no cumplir con los parámetros de confiabilidad requeridos.

- Existen métodos que pueden ser caros, consumir mucho tiempo, energía, o pueden no ser eficientemente automatizados.
- Existen métodos que pueden no proveer una adecuada sensibilidad o selectividad.
- Pueden surgir nuevos equipos que provean mejores condiciones de análisis.
- Puede ser necesario un método alternativo para confirmar los datos analíticos originalmente obtenidos por los métodos existentes.

Después de que la instrumentación ha sido seleccionada de acuerdo con lo anterior, es importante determinar los parámetros del analito de interés. Será necesario considerar las propiedades del (los) analito (s) y establecer el rango de posibles valores a obtener.

Hacer una búsqueda bibliográfica de constantes termodinámicas, propiedades físicas y químicas, etc. Revisar si existen estándares, si se ha reportado algún método para ese analito en especial etc.

Hacer diseño de modelos químicos a partir de las constantes encontradas y establecer condiciones óptimas, del método. (p.g. cuantitatividad de la reacción, condiciones óptimas de separación etc.)

5.3 OPTIMIZACION DE UN METODO ANALÍTICO.

La optimización se refiere a el mejoramiento de las condiciones en las cuales se había estado realizando un método, e involucra maximización en términos de mejorar rendimiento, resolución, tiempo de realización, reducción de pasos, mejoramiento de límites de cuantificación y en general mejoramiento de los parámetros de confiabilidad.

Los resultados obtenidos durante la optimización deberán ser evaluados, esta evaluación puede revelar que se requiere desarrollo y optimización de algunos otros métodos.

La optimización puede seguir cada uno de los dos procedimientos siguientes. 1) manual 2) computarizado.

El procedimiento manual involucra una variable experimental a un tiempo, manteniendo a las demás variables constantes y registrando los cambios de la primera. Estas variables pueden incluir velocidad de flujo de fase móvil, composición de la fase, temperatura, longitud de onda, pH etc. Este invariable acercamiento a la optimización del sistema es

lento, consume tiempo y es caro. Sin embargo este puede proveer un mejor entendimiento de los principios y teorías involucrados y las interacciones de las variables.

El segundo método aprovecha el desarrollo de técnicas automatizadas, en donde la eficiencia es optimizada mientras los datos de entrada son minimizados.

¿Pero como sabe el analista que el método ha sido realmente optimizado y esta listo para ser usado? , pues bien debe considerar los siguientes criterios:

- p.g. Si la resolución cromatografica es adecuada.
- Para mas muestras, si los limites de detección son bajos por lo menos en el orden de magnitud que se necesita.
- Las graficas de calibración son lineales en varios ordenes de magnitud empezando con los limites de cuantificación.
- La preparación de la muestra antes del análisis es en un mínimo de pasos.
- Las interferencias son minimizadas e identificadas .
- Los datos emitidos por la computadora pueden ser impresos, trasladados, manipulados y almacenados de varias formas. Si el software permite hacer todo esto.
- Se cumple con todos los parámetros de confiabilidad como precisión, exactitud linealidad, rango etc.
- Se minimizo el costo por análisis.



VALIDACION DE METODOS ANALÍTICOS

6.1 ANTECEDENTES

Los requerimientos de los laboratorios para el uso de métodos de análisis completamente validados son muy importantes ahora en muchos sectores de análisis. Los medios de validación total exigen evaluación por medio de estudios colaborativos (interlaboratorios). La importancia de esos requerimientos es descrita por que cada vez mas químicos analíticos requieren justificar sus opciones de métodos claramente. En conjunto los requerimientos y procedimientos que pueden ser usados para obtener métodos que hallan sido validados en el laboratorio (in-house) o a través de una validación completa a través de grupos colaborativos son también descritos por diferentes organismos normativos.⁽⁹⁾

Calidad es una noción relativa adecuada o inadecuada en términos de magnitud, en los cuales un producto, proceso o servicio reúne los requerimientos especificados de antemano por un cliente. El principal producto de un laboratorio de química analítica es la información acerca de la composición química de sistemas materiales, usualmente en términos de identidad o cantidad o de uno o mas componentes relevantes en muestras tomadas de esos materiales.

La calidad de la información científica en general es evaluada por estándares internacionalmente aceptados de objetividad, integridad y reproducibilidad, en algunos casos antes de su publicación. La validación de métodos analíticos es un paso esencial en el proceso integral de aseguramiento de calidad y control de calidad de mediciones químicas en sistemas materiales.⁽⁹⁾

La *AOAC INTERNATIONAL* es la única organización científica no lucrativa que tiene como propósito esencial servir a las necesidades de la industria gubernamental y laboratorios académicos con métodos analíticos y sistemas de calidad en las mediciones. El

programa *AOAC OFICIAL METHODS*, es designado para proveer métodos de análisis con conocidas características como exactitud, precisión, sensibilidad, rango, especificidad, límites de medición y atributos similares. Un prerrequisito de la adopción de la AOAC es la validación a través de un estudio colaborativo inter laboratorio en laboratorios independientes sobre condiciones estándares. Tales métodos validados pueden entonces ser usados por organizaciones gubernamentales y académicas con un alto grado de confiabilidad.⁽⁷⁾

Ahora se analizarán los parámetros a considerar para la validación de un método analítico, mas adelante veremos quienes y como lo hacen, revisaremos diferentes protocolos de organizaciones normativas y veremos como se desarrolla el programa completo de validación.

6.2 ERRORES EN EL ANÁLISIS QUÍMICO.

Una vez que aceptamos que los análisis químicos juegan un papel predominante en cualquier laboratorio analítico, debemos aceptar también que los errores que aparezcan en tales estudios son de gran importancia. Nuestro principio guía será que no existen resultados cuantitativos validos si no van acompañados de alguna estimación de los errores inherentes a ellos.

Los científicos experimentales hacen una distinción entre tres tipos de errores:

Crasos: son errores tan graves que no queda otra alternativa mas que abandonar el experimento y empezar de nuevo. (p.g. caída o derramamiento accidental de una muestra)

Aleatorios: estos provocan que los resultados individuales caigan a ambos lados del valor medio o convencionalmente verdadero. Tales errores afectan la precisión y la reproducibilidad.

Sistemáticos: provocan que todos los resultados sean erróneos en el mismo sentido. (muy altos o muy bajos respecto al valor verdadero. Estos errores afectan a la exactitud, es decir al valor verdadero).⁽⁸⁾

6.2.1 DISTRIBUCIÓN DE ERRORES.

Aunque la desviación estándar proporciona una medida de la dispersión de un conjunto de datos alrededor de un valor medio, no indica la forma en que están distribuidos los resultados. Para aclarar esto se puede utilizar un histograma de una serie de datos como el que se muestra en la figura 6.1

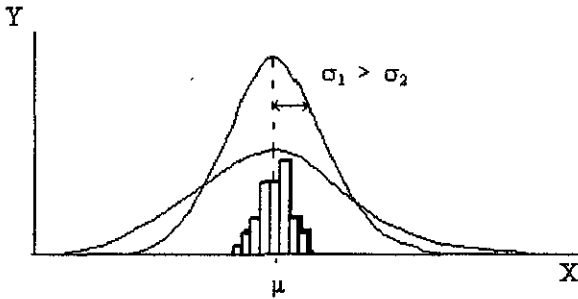


Figura 6.1

Tales mediciones presentan solo valores discretos, debido a las limitaciones del método de medición. En teoría podría haber valores de tal manera que se describiera la forma de la población de la que se extrajo la muestra, la que sería una curva continua. El modelo matemático que se utiliza es la distribución normal o Gaussiana descrita por la siguiente ecuación. Y graficada en las curvas de la figura anterior.

$$y = \frac{e^{-(x-\mu)/2\sigma^2}}{\sigma\sqrt{2\pi}} \tag{6.1}$$

La media \bar{X} nos proporciona una estimación de μ , de manera similar la población tiene una desviación estándar simbolizada por σ que es un valor estimado a partir de S.

Un análisis poco mas detallado demuestra que cualesquiera que sean los valores de μ y σ aproximadamente el 68% de los valores de la población caen dentro de $\pm 1\sigma$ de la media, cerca del 95% se ubican dentro de $\pm 2\sigma$ y casi el 99.7% se encuentran dentro de $\pm 3\sigma$ de la media.

Aunque no se pueda demostrar que las mediciones repetidas de cualquier cantidad analítica siempre van a estar distribuidas normalmente, las pruebas indican que por lo general esta hipótesis esta al menos muy cerca de la verdad.

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

6.2.2 LIMITES DE CONFIANZA DE LA MEDIA.

Ya que conocemos la forma de la distribución muestral de la media, podemos regresar al problema de utilizar una muestra para definir el intervalo dentro del cual podamos suponer de manera razonable que se encuentra el valor verdadero. Para esto se supone que no existen errores sistemáticos. Este intervalo se conoce como intervalo de confianza y los valores extremos de dicho intervalo se llaman limites de confianza. El término confianza implica que podemos afirmar con un grado de confianza dado, es decir con una cierta probabilidad que el intervalo de confianza si incluye al valor verdadero. Por supuesto el tamaño del intervalo de confianza dependerá de la certeza que queramos tener de que se incluya el valor verdadero; cuanto mas grande sea la certeza, mas grande es el intervalo requerido.

Cuando el tamaño de muestra se hace mas pequeño, la incertidumbre al utilizar S para estimar σ aumenta. Por ejemplo al calcular los limites con un intervalo de confianza al 95% en ves de usar $\mu = \bar{x} \pm 2.97(\sigma / \sqrt{n})$ usaremos $\mu = \bar{x} \pm t(S / \sqrt{n})$ donde el valor de t depende tanto de (n-1) grados de libertad como del grado de confianza requerido. Tal valor se encuentra en tablas.

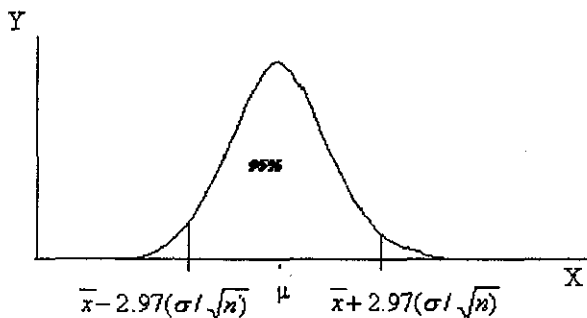


Figura 6.2

6.2.3 PRUEBAS DE SIGNIFICACIÓN

Una de las propiedades más importantes de un método analítico es que se encuentre libre de errores sistemáticos, es decir el valor dado para la cantidad de analito debería ser el valor verdadero. Esta propiedad se puede comprobar al aplicar el método a una muestra estándar que contenga una cantidad conocida de analito, sin embargo los errores aleatorios no permiten que la cantidad medida sea exactamente igual a la cantidad conocida, incluso aunque no hubiera error sistemático. Para decidir si la diferencia entre la cantidad medida y la cantidad conocida se puede justificar por estos errores aleatorios puede aplicarse una prueba estadística que se denomina prueba de significación. Esta aproximación prueba si son significativas las diferencias entre los dos resultados o si se pueden justificar solo por variaciones aleatorias.

Al realizar una prueba de significación comprobamos la veracidad de una hipótesis denominada hipótesis nula. Adoptamos como hipótesis nula aquella mediante la cual un método no se encuentra sujeto a errores sistemáticos. El término nulo se utiliza para indicar que no hay más diferencia entre lo observado y el valor conocido que la que puede atribuirse a la variación aleatoria.

Suponiendo que esta hipótesis nula es verdadera se puede utilizar la teoría estadística para calcular la probabilidad de que la diferencia observada entre la media muestral \bar{x} y el valor μ se deba solamente a un error aleatorio. Cuando más pequeña sea la probabilidad de que la diferencia observada ocurra por azar, menos probable será que la hipótesis nula sea verdadera. Por lo regular la hipótesis nula se rechaza cuando la probabilidad de que la diferencia observada ocurra por azar es menor que uno de cada 20 veces es decir 0.05 o 5% y en este caso se dice que la diferencia es significativa al nivel de 0.05 o 5%. Si utilizamos este nivel de significancia rechazamos en promedio la hipótesis nula, cuando sea de hecho verdadera, una de cada 20 veces. Para estar más seguros de que se toma la decisión adecuada se utiliza un nivel de significancia más pequeño por lo regular de 1 o 0.1%. Si se acepta la hipótesis nula no significa que hayamos probado que sea verdadera, solo que no hemos demostrado que sea falsa.

6.3. VALIDACIÓN Y CRITERIOS DE CONFIABILIDAD

La validación de un método analítico, puede definirse como un paso crítico cuyo propósito es asegurar su calidad o validez. El objetivo de la validación no es comparar un método con otro ya existente (método de referencia) si no conocer mejor sus características.

La validación corresponde a un estudio científico de los criterios de confiabilidad de esta técnica, estos criterios corresponden a: la exactitud, precisión, sensibilidad, límite de detección, especificidad, selectividad, y linealidad.

Estos criterios son específicos de una técnica en condiciones definidas, la apreciación de las cualidades del método se define en relación a una molécula, un método y un equipo dado.

En el siguiente punto observaremos como se pueden utilizar estos conceptos para realizar algunas pruebas estadísticas.

6.4 EXACTITUD Y PRECISION

6.4.1 EXACTITUD

Aproximación al valor verdadero

El valor verdadero que se trata de obtener al realizar una determinación analítica, es una noción ideal que imposibilita su conocimiento exacto.

Se puede aproximar al valor real mediante una distribución de valores. Esta aproximación depende de los medios utilizados y el observador o analista.

Dicha distribución obtenida en condiciones especiales por el método considerado el más exacto, teniendo en cuenta los conocimientos analíticos actuales, ofrece la mejor aproximación al valor real. Este método llamado "método convencionalmente exacto", debe usarse en condiciones técnicas bien definidas y constantes para estimar un valor convencionalmente verdadero.

En todos los casos es importante fijar las convenciones (métodos y condiciones de operación que sirven para establecer un valor convencionalmente verdadero.)

Por otra parte no hay que confundir el valor convencionalmente verdadero, con un valor blanco. Establecido por un grupo de expertos o especialistas, con un método cuya exactitud se ha evaluado.

Este valor llamado “valor de referencia de exactitud” de un método (que no necesariamente se considera el más exacto) permite expresar la exactitud relativa de un método por referencia a los resultados de los laboratorios expertos.

Sin embargo, actualmente no existen métodos “convencionalmente exactos” ni técnicas de referencia en lo que se refiere a análisis cuantitativo.

En consecuencia es imposible basarse en un valor convencionalmente verdadero para juzgar la exactitud de una técnica analítica.

6.4.2 EVALUACIÓN DE LA EXACTITUD

En función de lo expuesto esta prueba se destina a estimar la exactitud del método descrito en relación a un método considerado exacto.

La exactitud representa la cualidad de concordancia entre el valor medido y el valor verdadero o convencionalmente verdadero.

La inexactitud se expresa por la diferencia entre una serie de mediciones repetidas y el valor verdadero o convencionalmente verdadero.

La exactitud se determina fácilmente cuando (caso ideal):

- Se dispone de patrones cuyo valor convencionalmente verdadero se conoce.
- La precisión del método es tal que la amplitud de los errores fortuitos no interfiere con la medición de la exactitud.
- La inexactitud relativa es constante en la zona de los valores considerados.

Los problemas surgen cuando no es posible utilizar patrones de referencia o para la medición de concentraciones, disponer de soluciones patrón primarias o secundarias, cuyas proporciones verdaderas se conozcan o determinen por métodos analíticos considerados exactos.

Estos problemas se dan en el análisis cuantitativo. Hasta ahora no existe un procedimiento ideal para determinar la exactitud de los métodos.

Es conveniente proponer procedimientos que permitan aproximarse a la exactitud de un método. Se pueden mencionar tres procedimientos. Cada uno tiene sus ventajas y sus inconvenientes, pero ninguno de ellos es enteramente satisfactorio.

- Comparación de los resultados obtenidos por varios métodos.

Este procedimiento consiste en comparar los resultados que proporcionan las mismas muestras mediante varios métodos, estudiarlos de manera estadística y crítica teniendo en cuenta sus principios y decidir así el grado de inexactitud de cada uno de ellos. Este procedimiento puede ser muy pesado y difícil en el aspecto de las interpretaciones.

- Utilización de una media general al realizar un control de calidad.

Esta media general se calcula para una muestra determinada, empleando todas las técnicas analíticas. Se obtiene al tomar en cuenta todos los valores de los resultados obtenidos. Esta media general se puede obtener al utilizar los datos provenientes de un programa de control de calidad.

Algunos autores calculan esta media general prescindiendo de los valores extremos que consideran aberrantes. Este paso no parece satisfactorio porque, un resultado aunque sea muy distinto de los demás, no es forzosamente falso. Se puede considerar que solo este valor es exacto y que en consecuencia todos los demás no lo son. Esto se observa mejor conforme el número de resultados disponibles es bajo.

La media general toma en cuenta la frecuencia de los resultados obtenidos. Sin embargo, no hay que considerar que un resultado es exacto, aunque la mayoría de los laboratorios obtengan este valor.

Estrictamente hablando, la media general no puede considerarse como un valor convencionalmente verdadero.

- Utilización de una concentración teórica a partir de una pesada.

La obtención de soluciones que sirvan para el estudio de la precisión se efectúa de acuerdo con las etapas siguientes:

- a) Pesada de la materia prima.
- b) Preparación de una solución.

Estas etapas hacen pensar que la concentración teórica obtenida con base en la pesada no puede utilizarse como valor convencionalmente verdadero. En efecto la etapa de la preparación constituye una operación que no se puede controlar en el aspecto de su reproducibilidad. Los fenómenos de absorción en los recipientes o de

disolución no son cuantificables. En consecuencia no se puede corregir con un factor constante el valor calculado con base a la pesada.

En conclusión ninguna de las tres proposiciones es totalmente satisfactoria. Sin técnica analítica exacta no se puede obtener el valor verdadero o convencionalmente verdadero.

OBSERVACIONES:

- Es importante determinar si la evaluación de la exactitud depende de la concentración.
- Solo después de asegurarse de su consistencia se puede tomar en cuenta la inexactitud para el cálculo de los resultados exactos.
- El estudio de la función de calibración proporciona información importante sobre la exactitud de un método.
- La especificidad de un método tiene la capacidad de influir grandemente en la exactitud de un método.
- Fuera de la zona de linealidad, la exactitud decrece rápidamente. Esta también decrece al acercarse al límite de detección.

Ahora se consideraran una serie de ejemplos en los cuales se aplicaran las técnicas estadísticas para determinar los parámetros de confiabilidad.

Ejemplo 6.1

Es necesario determinar la exactitud de un método cromatográfico.

En un laboratorio farmacéutico se analizaron 5 estándares de Ibuprofen con las siguientes concentraciones: 80.0, 90.0, 100.0, 110.0 y 120.0 mg/tableta, los cuales fueron analizados cuatro veces cada uno y se obtuvieron los resultados que se muestran en la tabla 6.1

Tabla 6.1

No.	Cantidad adicionada	Cantidad recuperada				% de recobro	\bar{X}
1	80.0	79.5	80.9	81.2	79.8	100.44	80.35
2	90.0	91.2	88.0	90.2	89.7	99.74	89.77
3	100.0	100.0	99.0	98.0	98.5	98.87	98.87
4	110.0	108.0	109.5	108.0	107.5	98.41	108.25
5	120.0	118.0	119.0	117.0	118.5	98.43	118.12

$$\bar{X} = 99.08\% \quad (\text{media de medias y desviación estándar del \% de recobro})$$

$$\bar{S} = 0.9476\%$$

Para calcular el % de recobro:

% recobro = (promedio cantidad recuperada x 100) / cantidad adicionada.

p.g. para muestra 1 el % recobro = $(80.35 \times 100) / 80 = 100.44\%$

Basándose en el concepto de valor medio de una serie de observaciones, muestra una distribución alrededor del valor medio estimado de una serie finita, entonces la media tiene una función de probabilidad cuya distribución se asemeja a la distribución gaussiana, es llamada la distribución t de Student.

Los valores de t están tabulados para la probabilidad de una media en particular que pertenezca a una población de medias determinadas. Para establecer si un método analítico es exacto o no se plantea una hipótesis nula H_0 y una hipótesis alternativa H_1 .

$H_0: \mu = \mu_0 \quad \mu_0 = \text{recobro del } 100\%$

$H_1: \mu \neq \mu_0 \quad \mu = \text{valor real del \%}$

Considerando que la prueba de la t de Student es un método estadístico para detectar la diferencia entre un valor medio y un valor real con tamaño de muestra $n \leq 30$.

La t_{calc} se refiere a la t de Student expresada en la siguiente ecuación.

$$t_{\text{calc}} = \frac{\bar{x} - \mu_0}{\bar{S} / \sqrt{n}} \quad (6.2) \quad \text{se calcula } \bar{X} = 99.08\% \quad \text{que se consideraran como media y}$$

$$\bar{S} = 0.9476\%$$

desviación estándar.

$$t_{\text{calc}} = \frac{99.08 - 100}{0.9476 \sqrt{5}} = -2.18$$

Una vez obtenido el valor de t calculada ver la tabla 3 del anexo y obtener el valor de t con un nivel de significancia del 5%, $\alpha = 0.05$ y con $n-1 = 4$ grados de libertad. Y se obtiene el intervalo de confianza.

$$t_{\text{tablas}} = 2.776 \quad \mu = \bar{x} \pm \frac{t_{\text{tablas}} \bar{S}}{\sqrt{n}} = 99.08 \pm \left[\frac{2.776 \times 0.9476}{\sqrt{5}} \right] = 99.08 \pm 1.1764 \quad (6.3)$$

Criterio de aceptación:

$$t_{\text{tablas}(0.05/2, n-1)} < t_{\text{calc}} < t_{\text{tablas}(1-0.05/2, n-1)} \quad -2.776 < -2.31 < 2.776$$

Conclusión: se acepta H_0 , el método es exacto.

6.4.3 COMPARACIÓN CON UN METODO CONVENCIONALMENTE EXACTO.

Suponga que se desea determinar la exactitud de un método recientemente desarrollado que denominaremos “método químico” comparándolo con uno convencionalmente aceptado como exacto, (rayos X) : para determinar si el método nuevo es exacto se deberá probar si existe una diferencia entre el análisis químico y el análisis con rayos X. Este método permite conocer la cantidad de hierro en un material. Se emplean 5 muestras de un compuesto con hierro. Cada muestra se parte en dos submuestras y se les aplica a ambas los dos tipos de análisis. Los datos codificados que indican el análisis de contenido de hierro se muestran en la tabla 6.2

Tabla 6.2

Análisis	Rayos X μ_1	Químico μ_2	d_i	d_i^2
1	2.0	2.2	-0.2	0.04
2	2.0	1.9	0.1	0.01
3	2.3	2.5	-0.2	0.04
4	2.1	2.3	-0.2	0.04
5	2.4	2.4	0.0	0.00
		Σ	-0.5	0.13

Donde d_i = diferencia de los dos métodos.

1. $H_0: \mu_1 = \mu_2$ o $\mu_1 - \mu_2 = 0 = d_0$
2. $H_1: \mu_1 \neq \mu_2$
3. El valor de t de tablas para $5-1=4$ grados de libertad y un intervalo de confianza del 95% es $t_{\text{tablas}}=2.776$.
4. Criterio de aceptación $-2.776 \leq t_{\text{calc}} \leq 2.776$

$$5. \quad \bar{d} = -0.5/5 = -0.1 \quad \text{y} \quad S^2d = [(5)(0.13) - (-0.5)^2]/(5)(4) = 0.02 \quad Sd = 0.14142$$

$$t_{calc} = \frac{\bar{d} - d_0}{Sd/\sqrt{n}} = \frac{-0.1 - 0}{0.14142/\sqrt{5}} = -1.6 \quad (6.4)$$

6. Conclusión: Se acepta H_0 y se concluye que los métodos de análisis no son significativamente diferentes. Por lo que el método químico también se puede considerar exacto.

6.4.4 PRECISION.

Representa la calidad de la concordancia entre las distintas mediciones de una misma muestra en condiciones determinadas. Se utilizan términos especiales para designar cada tipo de evaluación de la precisión en función de:

- De la distribución de las mediciones en el tiempo.
- Del técnico.
- De las condiciones de operación.

De esta manera en función de la secuencia de las mediciones, se distingue la repetibilidad y la reproducibilidad.

6.4.5 EVALUACIÓN DE LA PRECISION:

De acuerdo con las condiciones de operación, la precisión será la medida de la repetibilidad o de la reproducibilidad.

Pruebas de repetibilidad:

- Mismo técnico.
- Misma muestra
- Mismo laboratorio
- Mismo equipo y reactivos.
- Misma serie de análisis.

Esta prueba comprende la determinación de las diferentes expresiones de la precisión a partir de una serie de por lo menos 30 determinaciones. Si no se logran esas condiciones, la expresión de la repetibilidad no se da o se da con reservas.

Pruebas de reproducibilidad:

Esas pruebas de reproducibilidad ofrecen al técnico diferentes expresiones de la precisión teniendo en cuenta a la vez las diferentes condiciones de realización del método y las diversas definiciones del tipo de reproducibilidad.

Reproducibilidad en el laboratorio:

La reproducibilidad, en un laboratorio dado, puede ser en una misma serie o entre varias series.

Para medir la reproducibilidad dentro de una misma serie, la muestra se distribuye al azar en diversas series de análisis, el mismo día y se analiza con los mismos reactivos y patrones.

La reproducibilidad entre series se determina en la misma muestra, en días diferentes, en series diversas, con reactivos y patrones distintos.

En todos los casos se requiere el número mínimo de 30 mediciones para garantizar una distribución gaussiana de los resultados.

Reproducibilidad entre laboratorios:

Las muestras se distribuyen en varios laboratorios. Cada uno de ellos los analiza independientemente en las condiciones definidas para la repetibilidad. El número de laboratorios será por lo menos de tres.

Observaciones:

- Cabe destacar que una buena precisión no necesariamente significa una buena exactitud.

- Parece mas interesante disponer de un método preciso e inexacto que lo contrario. Esta observación es valida cuando se conoce la inexactitud del método. (evaluación del error sistemático)
- Las muestras utilizadas deben permanecer estables y homogéneas, todo el tiempo que duren las pruebas.
- El muestreo debe situarse en al zona de los valores determinados del método

6.4.6 PRECISION.

La precisión se evalúa en función de la repetibilidad y la reproducibilidad.

Precisión = repetibilidad + reproducibilidad.

La función estadística en la que se basa esta determinación es la varianza, esta nos da la distribución de los resultados obtenidos por el método de análisis bajo las mismas condiciones de trabajo. En primer lugar calculamos el parámetro χ^2 distribución Ji-Cuadrada:

$$\chi^2 = \frac{[n-1]S^2}{\sigma^2} \quad (6.4)$$

Donde

n = numero de mediciones de la muestra

S² = varianza de la muestra.

σ^2 = varianza poblacional y representa la variabilidad del método.

$$\sigma^2 = \frac{1}{ni-k} \sum [N-1]S^2j \quad (6.5) \quad S^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (Xi - \bar{X})^2}{N} \quad (6.6)$$

Donde

ni = mediciones de la i-esima muestra.

S²j = varianza de la j-esima muestra.

K = numero de muestras.

N = mediciones totales.

Ejemplo 6.2

Se desea determinar la repetibilidad del método cromatográfico del ejemplo anterior.

Se mide la cantidad de Ibuprofen en el laboratorio con el mismo instrumento, en tres días con el mismo analista obteniéndose los valores que se muestran en la tabla 6.3

Tabla 6.3

Lectura	Día 1	Día 2	Día 3
1	90.1	88.0	89.8
2	90.4	89.2	89.9
3	89.5	90.4	90.0
4	90.2	90.1	90.0

A continuación se calculan las varianzas, las medias y la gran media.

S^2_j	0.15	1.162	0.009
\bar{X}_j	90.05	89.42	89.925

$\bar{X} = 89.8$ considerando que:

$N = 12$

$n = 4 = n_i$

$k = 3 =$ numero de columnas

se determinan los grados de libertad $gl = (4-1)(3-1) = 6$

sustituyendo en ecuación 6.5 y 6.6 anteriores.

$$\sigma^2 = \frac{1}{9} [3(0.15) + 3(1.162) + 3(0.009)] = 0.4403$$

$$S^2 = \frac{(90.1 - 89.8)^2 + (90.4 - 89.8)^2 + (89.5 - 89.8)^2 + \dots + (90 - 89.8)^2}{12} = 0.4033$$

Hipótesis:

H_0 : la varianza poblacional es igual a 0.4403

H_1 : la varianza poblacional es diferente de 0.4403

sustituyendo para obtener $\chi^2 = \frac{(11)(0.4033)}{0.4403} = 10.07$

El criterio de aceptación esta dado por la siguiente relación:

$\chi^2_{\text{calc}} < \chi^2_{i, \alpha/2}$ ahora se busca en la tabla 4 del anexo el valor de χ^2 tablas con un nivel de significancia del 5% ($\alpha=0.05$) con 6 grados de libertad y se obtiene $\chi^2_{i, \alpha/2} = 12.59$

Conclusión: Siguiendo el criterio anterior aceptamos la hipótesis nula y determinamos que el método es repetible.

6.4.7 CRITERIOS DE ACEPTACIÓN EN ANÁLISIS FARMACÉUTICO

El comité de elaboración de guías oficiales de validación de la dirección general de control de insumos para la salud, SSA. Los siguientes criterios de aceptación para diferentes métodos analíticos.

Tabla 6.4

Método	r y r^2	CV.
Cromatograficos	$r \geq 0.99$ $r^2 \geq 0.98$	$\leq 2\%$
Titrimetricos		$\leq 2\%$
Químicos y		$\leq 3\%$
espectrofotometricos		$\leq 3\%$
Microbiológicos		$\leq 5\%$

Del ejemplo 6.2 obtenemos el coeficiente de variación:

$$CV = \left(\frac{S}{\bar{X}} \right) 100 \text{ sustituyendo la ecuación anterior } CV = \left(\frac{0.66}{89.6} \right) 100 = 0.74\% \quad (6.7)$$

como es menor de 2% (para métodos Cromatograficos) se considera un método aceptable.

Horwitz derivó una ecuación después de obtener aproximadamente 3000 resultados de estudios colaborativos (interlaboratorios), tal ecuación describe la variación del coeficiente de variación en función de la concentración (C) de analito determinado.

$$CV = 2^{(1-0.5 \log C)} \quad (6.8)$$

La grafica (6.1) de esta ecuación muestra como aumenta de manera exponencial el coeficiente de variación, al disminuir la concentración tomando valores de 45% para concentraciones de 10^{-9} ppb, el coeficiente de variación es independiente de la matriz y analito.⁽¹⁶⁾

FUNCION DE HORWITZ

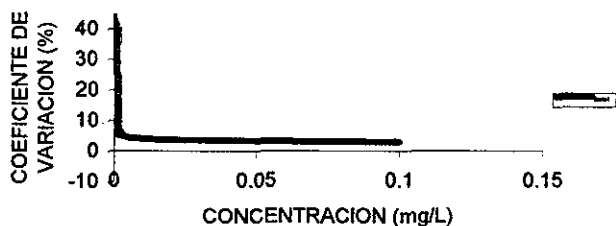


Grafico 6.1

6.4.8 ANÁLISIS DE VARIANZA Y REPRODUCIBILIDAD.

El análisis de varianza o mas brevemente ANOVA se refiere en general a un conjunto de situaciones experimentales y procedimientos estadísticos para el análisis de respuestas cuantitativas de unidades experimentales. El problema mas sencillo de ANOVA se conoce indistintamente como ANOVA de un solo factor de clasificación única o en una dirección donde interviene ya sea el análisis de datos a los que se hace muestreo a partir de mas de dos poblaciones numéricas (distribuciones), o datos de experimentos en los que se han empleado mas de dos tratamientos.

Tabla 6.5

Medición A	Medición B	Medición C	I = numero de columnas. J = numero de renglones.
X ₁	X ₁	X ₁	
.	.	.	
X _J	X _J	X _J	
$\sum X = x_i.$	$\sum X = x_i.$	$\sum X = x_i.$	x..
$x_i/J = \bar{x}_i.$	$x_i/J = \bar{x}_i.$	$x_i/J = \bar{x}_i.$	

La característica que diferencia a los tratamientos o poblaciones entre si se llama factor bajo estudio y los tratamientos o poblaciones diferentes se conocen como niveles del factor.

Un ejemplo sería un experimento para determinar los efectos de los resultados de cuatro analistas en tres días diferentes.

Con la reproducibilidad se determina si existe efecto por el analista, equipo, condiciones experimentales, etc. Mediante un análisis de varianza para un factor. Si se tiene una tabla con datos similar a la tabla 6.5 se pueden aplicar las ecuaciones de la tabla 6.6

Tabla 6.6 Formulas de computo para ANOVA

La suma total de cuadrados (SST), suma de cuadrados de tratamiento (SSTr), y la suma de cuadrados del error (SSE) están dados por:

$$SST = \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J (x_{ij} - \bar{x})^2 = \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J x^2_{ij} - \frac{1}{IJ} x^2_{..} \quad (6.9)$$

$$SSTr = \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J (\bar{x}_i - \bar{X})^2 = \frac{1}{J} \sum_{i=1}^I x^2_i - \frac{1}{IJ} x^2_{..} \quad (6.10)$$

$$SSE = \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J (x_{ij} - \bar{x}_i)^2 \quad \text{donde } x_i = \sum_{j=1}^J x_{ij} \quad \text{y} \quad x_{..} = \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J x_{ij} \quad (6.11)$$

$$SST = SSTr + se \quad (6.12)$$

Tabla 6.7 Valores de ANOVA

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Fcalc.
Tratamientos	(I-1)	SSTr	MSTr=SSTr/(I-1)	$F = \frac{MSTr}{MSE}$
Error	I(J-1)	SSE	MSE=SSE/I(j-1)	
total	IJ-1	SST		

Ejemplo 6.3

En la tabla 6.8 se muestran los resultados del análisis de 4 muestras iguales de agua de mar en las cuales se determino la cantidad de yoduro en ppm, en diferentes laboratorios. Demostrar con un análisis de varianza si las medidas son reproducibles.

Tabla 6.8

Laboratorio A	Laboratorio B	Laboratorio C	I= 3 columnas J=4 renglones
91.2	90.5	89.0	
88.0	91.0	88.5	
90.2	90.2	88.7	
89.7	89.5	89.2	Total
$\sum X = x_{i.} = 359.1$	$\sum X = x_{i.} = 361.2$	$\sum X = x_{i.} = 355.4$	$x_{..} = 1075.7$
$x_{i./J} = \bar{x}_{i.} = 89.775$	$x_{i./J} = \bar{x}_{i.} = 90.300$	$x_{i./J} = \bar{x}_{i.} = 88.850$	

Hipótesis:

Ho: $\mu_1 = \mu_2 = \mu_3$ (medias de cada laboratorio)

Hi: al menos dos medias son diferentes.

Criterio de aceptación:

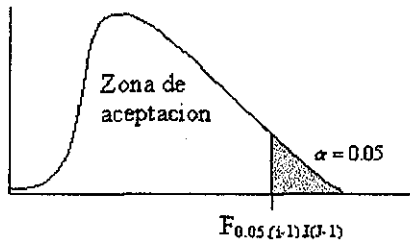


Figura 6.3

Se rechaza Ho si $F_{calc} \geq F_{0.05, (I-1), I(J-1)}$ $F_{0.05, 2, 9} = 4.26$ (buscar en la tabla 5 del anexo)

Iniciamos calculando:

$$\sum_{i=1}^3 \sum_{j=1}^4 x^2_{ij} = (91.2)^2 + (88.0)^2 + \dots + (89.2)^2 = 96438.69$$

$$SST = 96438.69 - \frac{1075.7^2}{(3)(4)} = 11.1492$$

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

$$SSTr = \frac{1}{4} [359.1^2 + 361.2^2 + 355.4^2] - \frac{1075.7^2}{(3)(4)} = 4.3117$$

$$SSE = SST - SSTr = 11.1492 - 4.3116 = 6.8375$$

Valores de ANOVA ejemplo 6.3

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Fcalculada.
Tratamientos	(I-1)=2	SSTr=4.3116	MSTr=SSTr/(I-1)=2.1558	$F = \frac{MSTr}{MSE}$ F= 2.8377
Error	I(J-1)=9	SSE=6.8376	MSE=SSE/I(j-1)=0.7597	
total	IJ-1 = 11	SST=11.1492		

Conclusión: como F calculada es menor que F de tablas se acepta Ho y se concluye que no hay diferencia entre los datos de los laboratorios por lo tanto el método es reproducible.

Ejemplo 6.4

En la tabla 6.9 se muestra una serie de datos obtenidos por 4 analistas, en 3 días a partir de un método cromatográfico. En base a los criterios anteriores determinar si el método es reproducible. Se debe hacer un análisis de varianza de dos factores con efectos aleatorios.

Tabla 6.9

Días (J = 3)	Analista (I =4)				Total renglones
	1	2	3	4	
1	67.4	67.8	68.8	70.5	274.5
2	65.8	67.5	69.2	69.7	272.2
3	65.7	66.7	66.9	68.3	267.6
Total columnas	198.9	202.0	204.9	208.5	814.3=x..

HIPÓTESIS:

Factor analista:

Ho: $\mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4$

H_i: al menos un par de medias (de analistas) son diferentes.

Factor día:

H_o: $\mu_1 = \mu_2 = \mu_3$

H_i: al menos un par de medias (en dos días) son diferentes.

Criterio de aceptación:

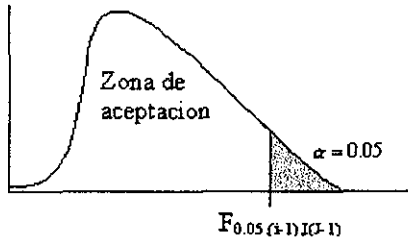


Figura 6.4

Se rechaza H_o si $F_{calc.} \geq F_{0.05, (i-1), I(I-1)}$ $i = 3 \text{ ó } 4$ $F_{0.05, 2, 6} = 5.14$ $F_{0.05, 3, 6} = 4.76$

Iniciamos calculando:

$$\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J x^2_{ij} = (67.4)^2 + (65.8)^2 + \dots + (68.3)^2 = 55281.79$$

$$SST = 55281.79 - \frac{1}{(4)(3)}(814.3)^2 = 24.75$$

$$SSA = \frac{1}{4}[(274.5)^2 + (272.2)^2 + (267.6)^2] - \frac{1}{(4)(3)}(814.3)^2 = 6.1717$$

$$SSB = \frac{1}{3}[(198.9)^2 + (202)^2 + (204.9)^2 + (208.5)^2] - \frac{1}{(4)(3)}(814.3)^2 = 16.7825$$

$$SSE = SST - (SSA + SSB) = 24.75 - (6.17 + 16.7825) = 1.7950 \quad (6.13)$$

Valores de ANOVA del ejemplo 6.4

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Fcalculada.	Ftablas.
Factor A Día	(I-1) = 2	SSA = 6.17	MSA = 3.085	10.31	5.14
Factor B Analista	(J-1) = 3	SSB = 16.7825	MSB = 5.5942	18.70	4.76

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Error	(I-1)(J-1) = 6	SSE = 1.795	MSE = 0.2992		
total	IJ - 1 = 11	SST = 24.75			

Conclusión: como F calculada es mucho mayor que Ftablas se rechaza Ho y se acepta Hi y se concluye que al menos un par de medias es diferente tanto para el factor A (Día) como para el factor B (Analista). Por lo tanto el método no es reproducible.

6.4.9 COMPARACIONES MULTIPLES EN ANOVA DE DOS FACTORES.

Cuando se ha rechazado Ho para el factor A (Día) o para el factor B (Analista) se puede utilizar el procedimiento de Tukey para identificar diferencias importantes entre los niveles de factor bajo investigación. Los pasos del análisis serán iguales para el ANOVA de un solo factor, claro considerando solo un factor.

En este procedimiento interviene el uso de una distribución de probabilidad llamada **distribución de rango studentizado**. La distribución depende de dos parámetros, un grado de libertad m del numerador y un grado de libertad v del denominador. Denotaremos por $Q_{\alpha, m, v}$ los valores de Q aparecen en la tabla 6 del anexo. Entonces el valor de Q se puede emplear para obtener intervalos de confianza simultáneos para todas las diferencias por pares $\mu_i - \mu_j$, el grado de libertad para el numerador es I que es el numero de tratamientos y no I-1 como fue para la F.

1. Para comparar niveles de factor A, obtenga $Q_{\alpha(I-1)(J-1)}$ seleccione α (0.05)
2. Para comparar niveles de factor B, obtenga $Q_{\alpha(I-1)(J-1)}$ seleccione α (0.05)

En ambos casos el subíndice I identifica el numero de niveles que se comparan y el tercer subíndice se refiere al numero de grados de libertad para el error.

3. Calcule la diferencia critica $w = Q\sqrt{MSE/I}$ (6.14)

Donde los términos de la raíz es la desviación estándar estimada de las medidas muestrales que se comparan.

$$Q_{\alpha(I-1)(J-1)} \cdot \sqrt{MSE/J} \text{ Para comparaciones del factor A} \quad (6.15)$$

$$Q_{\alpha(I-1)(J-1)} \cdot \sqrt{MSE/I} \text{ Para comparaciones del factor B} \quad (6.16)$$

4. Ordene las medias muestrales en orden descendente, seleccione los pares que difieren en menos de w y los que difieren en un valor mayor de w .

Por ejemplo identificaremos las medias significativamente diferentes del ejemplo 6.4

1. identificaremos las diferencias importantes entre los tres días y los cuatro analistas:

$$Q_{0.05,3,6} = 4.34 \quad \text{y} \quad w = 4.34 \cdot \sqrt{0.2995/4} = 1.1876 \quad \text{para factor A}$$

$$Q_{0.05,4,6} = 4.90 \quad \text{y} \quad w = 4.90 \cdot \sqrt{0.2995/3} = 1.5482 \quad \text{para factor B}$$

para el factor A (día)

$$\mu_1 = 68.625, \mu_2 = 68.05, \mu_3 = 66.9 : \quad \mu_1 - \mu_2 = 0.575 \quad \mu_1 - \mu_3 = 1.725$$

$\mu_2 - \mu_3 = 1.15$ como se puede observar el único par de medias cuya diferencia es mayor de w para el factor A es la 1 y la 3 lo que significa que las medidas de estos dos días difieren significativamente.

Para el factor B (analista)

$\mu_1 = 66.13, \mu_2 = 67.33, \mu_3 = 68.3, \mu_4 = 69.5$ si hacemos las diferencias al igual que para el factor A y las comparamos con w (B) nos damos cuenta que el analista 1 difiere del analista 3, el analista 1 difiere del analista 4 y el analista 2 difiere del analista 4.

Ejemplo 6.5 ANOVA de dos factores (diseños factoriales)

Ahora analizaremos un experimento de dos factores donde cada factor tiene dos o mas niveles.

Se determino la cantidad de plomo (ppm) en agua residual, por espectroscopia de absorción atómica. La determinación se realiza en tres diferentes laboratorios (factor A) y dos analistas diferentes por cada laboratorio (factor B). Determine si hay variación de los resultados de debida a los analistas, los laboratorios y si hay interacción entre estos. Los valores se muestran en la tabla 6.10

Prueba para los factores A y B

Ho: No hay diferencia entre las medias de los diferentes niveles del factor A ni del factor B

Hi: Al menos dos medias del factor A y del factor B difieren.

Prueba para la interacción de A y B

Ho: Las variables A y B no interactúan para afectar a la variable de respuesta.

Hi. Los factores A y B interactúan para afectar a la variable de respuesta.

Tabla 6.10

Factor B (J = 2)	Factor A (I = 3)		
	Laboratorio 1	Laboratorio 2	Laboratorio 3
Analista 1 (n = 3)	0.35	0.35	0.32
	0.34	0.36	0.30
	0.36	0.37	0.32
Analista 2 (n = 3)	0.32	0.29	0.30
	0.33	0.30	0.31
	0.30	0.28	0.31

Los totales son:

Factor B	Factor A			Total xi
	Laboratorio 1	Laboratorio 2	Laboratorio 3	
Analista 1	1.05	1.08	0.94	3.07
Analista 2	0.95	0.87	0.92	2.74
Total xi	2	1.95	1.86	5.81 = x..
Medias para los analistas	0.350	0.360	0.313	Analista 1
	0.317	0.290	0.307	Analista 2

Criterio de aceptación:

Se rechaza la hipótesis nula si la F calculada es mayor que la F de tablas.

$$AB \quad F_{0.05,(I-1)(J-1),IJ(n-1)} = F_{0.05,2,12} = 3.89$$

$$B \quad F_{0.05,(J-1),IJ(n-1)} = F_{0.05,1,12} = 4.75$$

$$A \quad F_{0.05,(I-1),IJ(n-1)} = F_{0.05,2,12} = 3.89$$

Cálculos:

$$\sum x^2_{ij} = (0.35^2 + 0.34^2 + 0.36^2 + \dots + 0.31^2) = 1.8875$$

$$SST = \sum x^2_{ij} - \frac{1}{IJn} (x_{..})^2 = 1.8875 - \frac{(5.81)^2}{(3)(2)(3)} = 0.01216$$

$$SSB = \sum x^2_{ij} / Jn - \frac{1}{IJn} (x_{..})^2 = \frac{(2^2 + 1.95^2 + 1.86^2)}{(2)(3)} - 1.8753 = 0.0017$$

$$SSA = \sum x^2_{ij} / In - \frac{1}{IJn} (x_{..})^2 = \frac{(3.07^2 + 2.74^2)}{(3)(3)} - 1.8753 = 0.0060$$

$$SSAB = \sum (AB_{ij})^2 / n - SSA - SSB - \frac{1}{IJn} (x_{..})^2 = \frac{(1.05^2 + 0.95^2 + \dots + 0.92^2)}{3} - 0.0060 - 0.0017 - 1.8753 = 0.00306$$

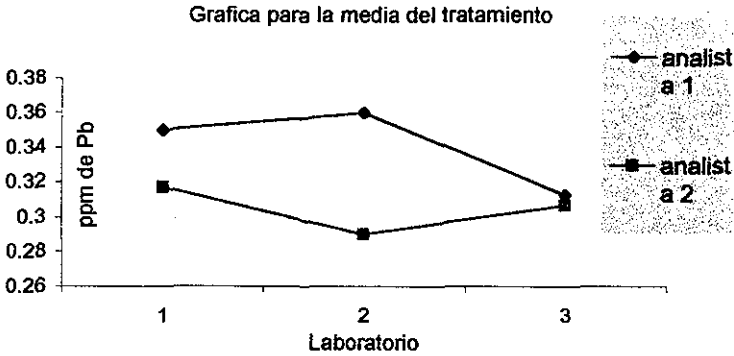
$$SSE = SST - SSA - SSB - SSAB = 0.01216 - 0.0060 - 0.0017 - 0.00306 = 0.0014 \quad (6.17)$$

Valores de ANOVA ejemplo 6.5

Fuente de variación	GL	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F calculada	F tablas
Factor A (laboratorio)	I-1 = 2	SSA = 0.0060	MSA = 0.003	$\frac{MSA}{MSE} = 25.64$	3.89
Factor B (analista)	J-1 = 1	SSB = 0.0017	MSB = 0.0017	$\frac{MSB}{MSE} = 14.53$	4.75
Interacción AB	(I-1)(J-1) = 2	SSAB = 0.00306	MSAB = 0.00153	$\frac{MSAB}{MSE} = 13.077$	3.89
Error	II(n-1) = 12	Se = 0.0014	MSE = 0.000117		
Total	17	SST=0.01216			

Conclusión: se rechaza la hipótesis nula, lo que indica que tanto los factores A y B como la interacción AB afectan la variable de respuesta y el método no es reproducible ni por los analistas ni por los laboratorios. Se pueden hacer comparaciones de medias usando el método de Tukey mostrado en el ejemplo 6.4

Como podemos observar en la grafica 6.2 no se puede ver claramente la interacción entre analista y laboratorio, sin embargo debido a la tendencia de las líneas si puede haber interacción.



Grafica 6.2

6.4.10 CUADRADOS LATINOS

En casos anteriores se manejaron diferentes fuentes de variación desde un factor, dos factores, pero cuando se manejan mas factores puede surgir un problema y es que puede aumentar el tamaño del experimento mas allá de los limites prácticos.

Para resolver este problema se puede usar un diseño en el que cada tratamiento aparece una vez en cada fila y una vez en cada columna y recibe el nombra de cuadrado latino. En general un cuadrado latino es una disposición en cuadrado de las letras A, B, C, D,.... , que es tal que cada letra ocurre una y solo una vez en cada renglón y en cada columna.

Ejemplo 6.6

Se quiere determinar si hay variación en los resultados de un método analítico en el cual se determina la dureza del agua, al variar algunas condiciones experimentales como: 4 diferentes analistas, 4 diferentes laboratorios y 4 diferentes días (A,B,C y D). Los valores de dureza expresados en (mg/L) de Carbonato de Calcio se muestran en la tabla 6.10

Tabla 6.10

Analistas	Laboratorios				Total xi
	1	2	3	4	
Analista 1	A 49.5	B 50.3	C 50.6	D 49.0	199.4
Analista 2	B 49.5	C 50.2	D 50.5	A 49.1	199.3
Analista 3	C 49.4	D 50.4	A 49.3	B 49.2	198.8
Analista 4	D 50.1	A 49.5	B 50.1	C 49.9	199.6
Total xi	199	200.4	200.5	197.2	797.1=x..

Prueba de hipótesis:

Ho: No hay variación debida a los laboratorios, analistas y a los cuatro diferentes días.

Hi: Si hay variación por lo menos en un par de medias.

Criterio de aceptación: se acepta la hipótesis nula si:

$$F_{0.05,(r-1),(r-1)(r-2)} = F_{0.05,3,6} = 4.76 > F_{calculada}$$

r = numero de renglones = numero de columnas = 4

Cálculos:

$$\sum x^2 r = (49.5^2 + 49.5^2 + 49.9^2 + \dots + 49.9^2) = 39714.63$$

$$SST = \sum x^2 r - \frac{1}{r^2} (x..)^2 = 39714.63 - \frac{(797.1)^2}{(4)(4)} = 4.1044$$

$$SSR = \sum \frac{x^2 i}{r} - \frac{1}{r^2} (x..)^2 = \frac{(199.4^2 + 199.3^2 + 198.8^2 + 199.6^2)}{4} - 39710.5256 = 0.0869$$

$$SSC = \sum \frac{x^2 j}{r} - \frac{1}{r^2} (x..)^2 = \frac{(199^2 + 200.4^2 + 200.5^2 + 197.2^2)}{4} - 39710.5256 = 1.7869$$

Obtenemos los totales para A, B, C, D y obtenemos SSTr.

$$SSTr = \frac{(C1^2 + C2^2 + C3^2 + C4^2)}{r} - \frac{1}{r^2} (x..)^2 = \frac{(197.4^2 + 199.1^2 + 200.6^2 + 200^2)}{4} - 39710.5256 = 1.4569$$

$$SSE = SST - (SSR + SSC + SSTr) = 4.1044 - (0.0869 + 1.7869 + 1.4569) = 0.7737$$

Valores de ANOVA ejemplo 6.6

Fuente de variación	GL	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F calculada	F tablas
Renglones (analistas)	$r-1 = 3$	SSR=0.0869	MSR=0.02897	$\frac{MSR}{MSE} = 0.22$	4.76
Columnas (laboratorios)	$r-1 = 3$	SSC=1.7869	MSC=0.5956	$\frac{MSC}{MSE} = 4.62$	
Tratamientos (días)	$r-1 = 3$	SSTr=1.4569	MSTr=0.4856	$\frac{MSTr}{MSE} = 3.766$	
Error	$(r-1)(r-2)=6$	SSE=0.7737	MSE=0.12895		
total	15	SST=4.1044			

Conclusión: se acepta la hipótesis nula, no hay variación debida a los analistas, laboratorios y tratamientos (días). El método es reproducible.

6.5 METODOS DE CALIBRACIÓN Y LINEALIDAD

La evaluación de los datos se basa en la medición de las propiedades de los componentes. Estas propiedades mensurables se expresan en magnitudes. El resultado que suele ser una concentración (c), es función de la medida X de esta propiedad, esta relación llamada función analítica se escribe $c=f(x)$

La técnica analítica, de operar y el equipo influyen en esta función. Generalmente se trata de que sea sencilla (función lineal) para utilizar una constante de conversión fácil de manipular. Es necesario definir los límites de linealidad de esta función.

Para que sea a la vez cuantitativa y no arbitraria la función analítica debe establecerse mediante una serie de medidas de calibración con muestras de composición conocida y bien definida (patrones), por ejemplo en soluciones de composición definida (soluciones de contraste)

El procedimiento de calibración proporciona valores de medida X que corresponden a los valores c de diversos patrones.

La función empírica $x=g(C)$ se llama función de calibración y su grafica, curva de calibración.

El conocimiento de estas funciones es útil para el estudio de los resultados que se obtienen en medios simples como complejos.

Siempre que se realiza un análisis lo que se quiere es que la propiedad que se va a medir al analito y estándar, mantenga una relación lineal respecto a la concentración, puesto que es mas fácil trabajar con ecuaciones de líneas rectas que con ecuaciones cuadráticas, logarítmicas o exponenciales. Debido a esto se analizara que es la linealidad.

6.5.1 LINEALIDAD

Cuando nos referimos a linealidad en realidad nos estamos refiriendo a el comportamiento de una variable dependiente (y) con respecto a una variable independiente (x) el cual debe ser directamente proporcional, proporcionando una línea completamente recta.

El estudio de linealidad viene a ser un estudio de regresión. El método de la regresión consiste en estudiar la relación y su representación mediante un modelo matemático cuando uno de los valores no es aleatorio (x) y el técnico puede fijarlo a voluntad.

Esto permite verificar que la relación entre las cantidades introducidas en el sistema de medición y la respuesta instrumental es una recta que debe pasar por el origen o tener una ordenada en el origen.

En la practica se hace con ayuda del elemento en estudio, una curva de calibración cuya extensión es variable.

Los valores experimentales (x = concentración; valores no aleatorios fijados por el técnico y Y = respuesta del equipo), se registran en una grafica, que permite trazar la recta de regresión la cual puede ser la curva de calibración. Si la relación de concentración vs respuesta es una línea recta. La ecuación de la recta es del tipo $y = mx + b$ y se puede calcular a partir de las ecuaciones que se muestran en el ejemplo siguiente.

El método que permite calcular la recta se llama “método de mínimos cuadrados”.

El calculo de la ecuación de la recta puede completarse mediante el calculo del coeficiente de correlación r .

Este coeficiente es el reflejo de la proporcionalidad de la relación entre dos caracteres cuantitativos (concentración y respuesta).

La determinación de r no permite por sí sola verificar si la representación concentración-respuesta corresponde a una recta. El cálculo de este coeficiente solo es interesante para verificar la presencia de una relación entre dos variables y no para definir la linealidad de manera absoluta.

Ejemplo 6.7

Los 5 datos de X y Y que se muestran en la tabla 6.10 se obtuvieron de la tabla del ejemplo 6.1

La ecuación de la línea de tendencia de estos valores es de la forma $Y = mX + b$ de esta forma obtenemos los valores de m , b , r y r^2 .

$$b = \frac{\sum x^2 \sum y - \sum x \sum xy}{n \sum x^2 - (\sum x)^2} = \frac{(51000.0)(495.375) - (500.0)(50477.75)}{5(51000.0) - (500.0)^2} = 5.05 \quad (6.17)$$

$$m = \frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{n \sum x^2 - (\sum x)^2} = \frac{5(50477.75) - 500(495.375)}{5(51000.0) - (500)^2} = 0.94025 \quad (6.18)$$

$$r = \frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{\sqrt{(n \sum x^2 - (\sum x)^2)(n \sum y^2 - (\sum y)^2)}} = \frac{5(50477.75) - 500(495.375)}{\sqrt{(5(51000.0) - 500^2)(5(49963.5169) - 495.375^2)}} = 0.9999 \quad (6.19)$$

$$r^2 = 0.9998$$

Tabla 6.10

No.	Cantidad adicionada (X)	\bar{X} (Y)	X^2	Y^2	XY	X - Y	$(X - Y)^2$
1	80.0	80.35	6400.00	6456.12	6424.00	-0.35	0.09
2	90.0	89.77	8100.00	8059.55	8079.75	0.23	0.04
3	100.0	98.87	10000.00	9776.27	9887.50	1.13	1.21
4	110.0	108.25	12100.00	11718.06	11907.50	1.75	3.24
5	120.0	118.12	14400.00	13953.52	14175.00	1.88	3.61
Σ	500.00	495.375	51000.00	49963.51	50477.75	4.64	8.19

El valor de r es un número que satisface la desigualdad:

$$-1 \leq r \leq 1$$

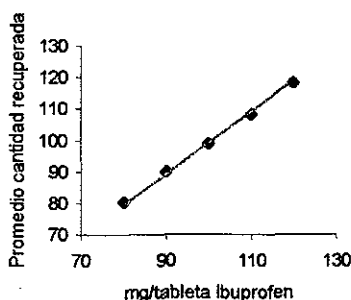
El coeficiente de correlación se interpreta de acuerdo con los siguientes casos:

1. Si r es positivo (+), la correlación entre las variables es positiva.
2. si r es negativo (-) la correlación entre las variables es negativa.
3. si $r = 0$, no existe relación lineal entre las variables.
4. si $r = 1$ la correlación entre las variables es máxima.
5. si $r = -1$ la correlación entre las variables es máxima.
6. si r es menor de 1 o mayor de -1 la correlación es fuerte o débil según r se aproxime a $|1|$ o a 0 .

El coeficiente de determinación es r^2 y toma valores entre 0 y 1 y al multiplicarlo por 100 determina el % de datos de Y que están determinados o que se deben a X .

En los casos en que se obtienen valores de r muy bajos será necesario aplicar una prueba estadística adecuada para ver si el coeficiente de correlación es realmente significativo, considerando el número de pares de valores usados en su cálculo.

En el gráfico 6.2 se la curva de este ejemplo.



Gráfica 6.2

En los casos en que se obtienen valores de r muy bajos será necesario aplicar una prueba estadística adecuada para ver si el coeficiente de correlación es realmente significativo, considerando el número de pares de valores usados en su cálculo.

Aunque en este ejemplo se tiene un valor de r muy próximo a 1 aplicaremos la prueba.

El método más simple es calcular un valor de t y compararlo con otro tabulado, para esto se plantean las siguientes hipótesis:

H_i: existe correlación significativa entre variables.

H_a: no existe correlación significativa.

Para un nivel de significancia de 5% y n-2 = 3 grados de libertad $t_{tablas} = 3.182$ (tabla 3 del anexo)

$$t_{calc.} = \frac{|r|\sqrt{(n-2)}}{\sqrt{(1-r^2)}} = \frac{0.9999\sqrt{(5-2)}}{\sqrt{(1-0.9998)}} = 122.46 \quad (6.20)$$

Criterio de aceptación $t_{calc} > t_{tablas}$ $122.46 > 3.18$

Conclusión: se acepta H_i: existe una correlación significativa.

6.5.2 ERRORES EN LA PENDIENTE Y LA ORDENADA AL ORIGEN DE LA RECTA DE REGRESIÓN.

Ejemplo 6.8

En la tabla 6.11 el valor de Y_i es el correspondiente valor de X obtenido de la ecuación de la recta de regresión del ejemplo 6.7

Tabla 6.11

X	Y	X ²	Y _i	Y - Y _i	(Y - Y _i) ²
80	80.35	6400.00	80.2700	0.0800	0.0064
90	89.77	8100.00	89.4725	0.1025	0.01005
100	98.87	10000.00	99.0750	0.2000	0.0400
110	108.25	12100.00	108.4775	0.2275	0.0518
120	118.12	14400.00	117.8800	0.2450	0.0600
$\bar{X} = 100$	$\bar{Y} = 99.072$	51000.00		0.850	0.1687
$\sum (X - \bar{X})^2 = 400 + 100 + 0 + 100 + 400 = 1000$					

La recta de regresión calculada en la acción anterior se utilizara en la practica para estimar la concentración de las muestras problema, por interpolación y quizás también para estimar el limite de detección del método. Los errores aleatorios en los valores de la pendiente y la

ordenada al origen son importantes por lo que consideraremos las ecuaciones para calcularlos.

$$S_{y/x} = \left\{ \frac{\sum_i (Y - Y_i)^2}{n - 2} \right\}^{\frac{1}{2}} = \left\{ \frac{0.1672}{3} \right\}^{\frac{1}{2}} = 0.2371 \quad (6.21)$$

$$Sm = \frac{S_{y/x}}{\left\{ \sum_i (X - \bar{X})^2 \right\}^{\frac{1}{2}}} = \frac{0.2361}{\sqrt{1000}} = 0.0075 \quad (6.22)$$

$$Sb = S_{y/x} \left\{ \frac{\sum X^2}{n \sum (X - \bar{X})^2} \right\}^{\frac{1}{2}} = 0.2361 \left\{ \frac{51000}{5(1000)^2} \right\}^{\frac{1}{2}} = 0.0239 \quad (6.23)$$

Los valores anteriores se pueden utilizar para estimar los límites de confianza para la pendiente y la ordenada al origen los cuales están dados por:

$m \pm tSm$ y $b \pm tSb$ donde el valor de t se obtiene para un nivel de confianza deseado (95%) y $(n-2) = 3$ grados de libertad.

$$m = 0.9402 \pm 3.18 \times 0.0075 = 0.9402 \pm 0.0239$$

$$0.9163 \leq m \leq 0.96411$$

$$b = 5.052 \pm 3.18 \times 0.0238 = 5.052 \pm 0.0757$$

$$4.9738 \leq b \leq 5.1262$$

6.5.3 RANGO (INTERVALO)

El rango de un método analítico, comúnmente llamado intervalo, esta definido por las concentraciones comprendidas entre los niveles de concentración superior e inferior del compuesto en estudio (incluyendo estos niveles) , en el cual se ha demostrado que el método es preciso, exacto y lineal.

Este concepto es de gran importancia no solo en análisis químico si no también en el desarrollo de modelos químicos que describen el comportamiento de un sistema. Es común observar en una curva de calibración obtenida de las medidas de absorbancia en relación a la concentración que cuando se manejan concentraciones muy altas la curva deja de ser

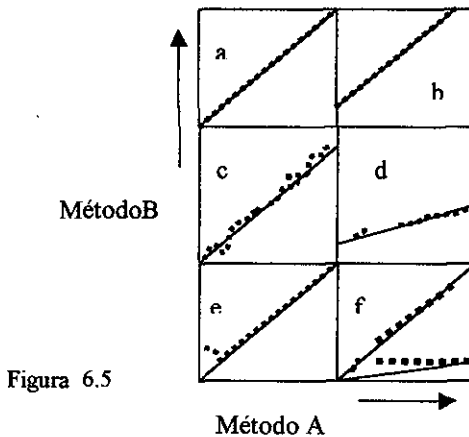
lineal en determinado valor de concentración, a esto se le conoce como desviaciones de la ley de Beer, y es un claro ejemplo de la importancia del rango del método.

El rango se puede determinar con el error estándar de regresión $S_{Y/X}$ evaluado en el punto anterior estableciendo como límite máximo 3 veces el error respecto a la recta de regresión. De esta forma aseguramos que solo los valores que se encuentran dentro de este límite se consideren y los demás se descarten.

6.5.4 USO DE RECTAS DE REGRESIÓN PARA COMPARAR METODOS ANALÍTICOS

Si un químico analítico desarrolla un método nuevo para determinar un analito concreto, deseara validarlo (entre otras técnicas), aplicándolo a un conjunto de muestras ya estudiadas mediante otro procedimiento estándar o de prestigio. El interés de la comparación será para identificar errores sistemáticos (¿proporciona el nuevo método resultados significativamente mas altos o mas bajos que el procedimiento establecido?).

Cuando se comparan métodos a diferentes concentraciones de analito se adopta el procedimiento siguiente.



Podemos ver en la figura 6.5 que pueden ocurrir desviaciones de la situación ideal ($a = 0$, $m = r = 1$) en una serie de circunstancias diferentes. En primer lugar es posible que la recta de regresión tenga una $r = 1$, pero una ordenada diferente de cero o sea que un método de análisis puede producir un resultado mas alto o mas bajo. Tal error podría ocurrir si se

calculó erróneamente la señal de fondo de uno de los métodos (caso b) una segunda posibilidad es que la pendiente de la recta sea menor o mayor de 1 lo que indica que puede darse un error sistemático en la pendiente de las gráficas de calibración individuales (caso c) otros posibles tipos de error sistemático se manifiestan si la curva no es recta (caso e) esto implicaría que el analito se encontrara en dos formas químicas distintas en proporciones que varían.

En la práctica el analista con frecuencia desea hacer pruebas estadísticas para contrastar, tales pruebas se realizan determinando los límites de confianza para la ordenada y la pendiente, como vimos anteriormente.

Es importante señalar que no siempre los datos se comportan de manera lineal, cuando ocurre así es necesario linealizar con algunas operaciones logarítmicas o simplemente ajustar a otra línea de tendencia por ejemplo exponencial, cuadrática, logarítmica etc.

6.5.5 REGRESIÓN NO LINEAL Y LINEALIZACIÓN.

Una vez que se ha observado que una serie de puntos de calibración no se ajustan satisfactoriamente a una línea recta. El analista puede transformar los datos de manera que una relación no lineal cambie a una lineal. Un método particularmente común es representar $\log Y$ y/o $\log X$ en vez de Y o X . Esto genera relaciones lineales de curvas originales de la forma $Y = pX^q$. Tales transformaciones se aplican muy regularmente en los resultados de ciertos métodos. Es importante señalar que la transformación puede afectar también la naturaleza de los errores en los diferentes puntos de la gráfica de calibración.

Si una simple transformación algebraica no puede transformar los datos en forma lineal será necesario ajustar a una curva no lineal y después usar esta curva para obtener la concentración del compuesto problema. Esto puede resultar un poco complicado. Sin embargo si la curvatura de la gráfica no es demasiado fuerte y si los puntos de calibración no están demasiado separados (condiciones usualmente satisfechas en trabajos analíticos prácticos), puede usarse un método sencillo aunque aproximado en lugar de la aproximación compleja del ajuste de curvas. En esta forma se trata a la curva como una serie de segmentos cortos y rectos, este método no proporciona límites de confianza para

las concentraciones, pero su sencillez lo hace muy atractivo y los errores sistemáticos son a menudo sorprendentemente pequeños.

6.6 PATRONES DE CALIBRACIÓN EXTERNA.

PATRONES: Los productos que entran en la composición de los patrones y los reactivos deben definirse exactamente y sobre todo incluir la indicación de las referencias comerciales o el modo de preparación o purificación. En la medida de lo posible debe conocerse su pureza. Así el patrón se titula.

CALIBRACIÓN EXTERNA

- La calibración es una verificación de las medidas físicas mediante la utilización de un patrón aceptado. Debe llevarse a cabo en un medio equivalente a las muestras analizadas pero sin la muestra. Este medio se sobrecarga con la sustancia estudiada.
- Por ejemplo para el análisis cuantitativo de un medicamento en medio biológico no es aceptable realizar una serie a partir de una solución pura (acuosa o metanólica), esta solución difiere de la matriz biológica.
- La calibración externa puede concebirse con respecto a un punto o a una curva de calibración. Se presentan los ejemplos teóricos y prácticos basados en este principio.

6.7 CALIBRACIÓN EXTERNA EN RELACION A UNA CURVA DE CALIBRACIÓN

Se requieren cinco puntos para llevar a cabo la calibración, excluyendo el blanco.

Las concentraciones de la curva deben cubrir la zona de concentración esperada del compuesto analizado..

En cada calibración debe correrse un blanco para descubrir la interferencia de otros componentes presentes en las muestras.

Pueden distinguirse tres tipos de blancos:

- El blanco reactivo que permite descubrir y eliminar una interferencia de los reactivos.

- El blanco “suero o matriz” que permite descubrir y eliminar una interferencia de los componentes de la matriz.
- El blanco “reconstituido” que permite descubrir y eliminar una interferencia de las sustancias asociadas al producto o muestra.

Si es necesario la calibración se realiza dos veces para mejorar la precisión de la recta de calibración. Cualquier punto dudoso en dicha recta se debe eliminar y no se debe tomar en cuenta ningún resultado fuera de la curva.

Los datos de calibración o de contraste se registran primero en papel milimétrico. Este paso permite reducir la subjetividad de la linealidad calculada por un método de regresión lineal.

Después se calcula :

- la pendiente de la curva de calibración.
- El coeficiente de correlación (r) y (r^2)
- Se hace el tratamiento estadístico adecuado (pruebas de significación y límites de confianza)

En el siguiente capítulo analizaremos todas las modalidades de curvas.

6.8 SENSIBILIDAD Y LIMITE DE DETECCIÓN

A veces el término sensibilidad de un método se usa mal y su utilización suele confundirse con el límite de detección. Conviene volver a esas definiciones e intentar explicarlas.

Un método se considera sensible cuando una baja variación de concentración C provoca variación importante en la respuesta instrumental Y y este es el caso cuando la derivada dy/dc es grande, es decir la pendiente de la recta de calibración es grande. (involucra la condición de que esta sea lineal) y puede medirse en cualquier punto de dicha recta.

De otra manera el límite de detección se calcula utilizando una parte del trazo cercano al origen de la recta de calibración.

Se define arbitrariamente como la menor concentración o cantidad de sustancia que puede distinguirse del valor del blanco con un intervalo de confianza fijo.

En conclusión la sensibilidad de un método no se expresa en términos de concentración.

Por tanto difiere fundamentalmente del límite de detección.

Las expresiones “sensibilidad de detección” o “umbral de sensibilidad” son inexactos y deben rechazarse.

6.8.1 ESTUDIO DE LA SENSIBILIDAD

La sensibilidad es el cociente de la señal medida entre el valor de la propiedad medida (aquí la concentración)

$$H = dy/dc$$

Depende a la vez

- de la calidad del método
- de la calidad del instrumento de medición

Cuando la función de calibración es lineal, la sensibilidad es constante hasta una concentración determinada. Cuando esta función no es lineal, conviene expresar la variación de la sensibilidad en función de la concentración fijando los límites de concentraciones utilizables.

Es conveniente volver a precisar que el concepto de sensibilidad se puede aplicar cualquiera que sea el valor de la concentración y que no se limita a las concentraciones bajas.

6.8.2 LIMITE DE DETECCIÓN

El límite de detección de un método es la señal más pequeña expresada en cantidad (o en concentración) que puede distinguirse con una probabilidad conocida de un blanco realizado en las mismas condiciones.

Se calcula por medio de la desviación estándar que expresa la precisión de las mediciones del blanco.

Para cantidades o concentraciones muy bajas es difícil saber si un valor observado para la señal Y se debe a la presencia de la sustancia analizada o a variaciones no controladas del blanco (impurezas de los reactivos, errores de manipulación, fluctuaciones de los aparatos de medición, reacciones secundarias, contaminantes etc.)

OBSERVACIONES

- Cuando un valor experimental es inferior al límite de detección, el resultado obtenido no debe ser cero, debe expresarse como no medible o no detectable o incluso inferior al límite de detección.
- Una buena sensibilidad instrumental no siempre significa un mejor límite de detección.
- Un valor publicado de límite de detección siempre debe volver a considerarse. Su valor depende estrictamente del factor instrumental, del procedimiento de las variaciones de los blancos de una serie a otra y de las muestras (presencia de sustancias interferentes distintas).

Los límites de detección pueden ser calculados, basándose en la desviación estándar (SD) de la respuesta o propiedad (Y) y la pendiente de la curva de calibración usando la siguiente ecuación

$$LD = \bar{X}_b + 3S_b \tag{6.24}$$

la desviación estándar de la respuesta puede ser determinada basada en la desviación estándar del blanco en la desviación estándar residual de la línea de regresión o la desviación estándar de la intersección de (Y) en la línea de regresión.

El método usado para determinar el LD debe ser documentado y soportado con un apropiado número de muestras que deberán ser analizadas para determinarlo.

Ejemplo 6.9

La siguiente tabla se muestra una serie de soluciones estándar de fluoresceína en un fluorímetro, obteniéndose los siguientes valores:

Intensidad de fluorescencia.	2.1	5.0	9.0	12.6	17.3	21.0	24.7
Concentración en pg/ml	0	2	4	6	8	10	12
Mediciones del blanco	2.1	2.3	2.0	2.2	2.0	2.2	2.1

La ecuación de la recta es $F = 1.93 C + 1.52$ la desviación estándar (S_b) del blanco Fluorescencia es 0.1112 y la media del blanco es 2.1285. Estime el límite de detección para el sistema: $LD = 2.1285 + 3(0.1112) = 2.4621 = F$ sustituyendo en la ecuación de la recta

obtenemos que el límite es 0.4881 picogramos por mililitro. Podemos ver que el límite en señal se encuentra cerca del blanco.

6.8.3 LIMITE DE CUANTIFICACION

El límite de cuantificación (LQ) está definido como la más baja concentración de analito en la muestra que puede ser determinada con una precisión y exactitud aceptable sobre las condiciones establecidas por el método.

Algunas veces la relación señal ruido en proporción 10 a 1 es usada para determinar este límite. Esta es una buena regla sin embargo hay que recordar el compromiso entre la concentración y la precisión y exactitud requeridas.

Cuando el límite de cuantificación decrece la precisión y exactitud también lo hacen. Por lo que es recomendable establecer un límite relativamente alto. Esto comúnmente ya está establecido por el método en uso.

La ICH (*International Conference on Harmonization of Technical requirements for Registration of Pharmaceutical for Human Use*) establece el método de la relación 10 a 1 como aceptable. También proporciona otras opciones que se pueden usar para este fin, como métodos visuales y cálculos.

Los métodos de cálculo están basados en la desviación estándar (SD) de la respuesta, y la pendiente (m) de la curva de calibración de acuerdo a la fórmula

$$LQ = \bar{X}_b + 10S_b \quad (6.25)$$

Nuevamente la desviación estándar de la respuesta o propiedad puede ser determinada basada en la desviación estándar del blanco o en la desviación estándar residual de la recta de regresión o de la desviación estándar de las intercepciones con (Y). Al igual que el LD el LQ deberá ser documentado y soportado con un apropiado número de muestras que deberán ser analizadas para validar este límite. Es importante señalar que la relación señal ruido va a variar de acuerdo al equipo que se está usando (en el método deberá indicar incluso el modelo del equipo que se deberá usar para, tamaño y tipo de accesorios).

Tanto el límite de detección como el de cuantificación casi nunca se evalúan ya que los métodos son demasiado empíricos, sin embargo la mayoría de los equipos de análisis instrumental ya los traen establecidos y pueden variar mucho de acuerdo a los equipos.

6.9 ROBUSTEZ Y DESIGUALDAD (ROBUSTNESS AND RUGGEDNESS)

Desigualdad (ruggedness) de acuerdo con la USP es el grado de reproducibilidad de los resultados obtenidos sobre una variación de las condiciones expresada en % en relación a la desviación estándar. Esas condiciones incluyen diferentes laboratorios, analistas, instrumentos, reactivos y periodos experimentales en la guía de definiciones de la ICH no citan este concepto, esta omisión es realmente un problema de semántica. En realidad la desigualdad (ruggedness) es un valor que mide la robustez de un método. Teniendo en cuenta que la robustez es la capacidad de un método para no afectarse por pequeñas variaciones hechas deliberadamente en los parámetros del método.

Tales variaciones pueden ser variación del pH, relación de solvente temperatura, etc. Como documenta la ICH la robustez debe ser considerada en el desarrollo de los métodos.

La traducción de ruggedness es un tanto inexacta, en realidad se refiere a la variación de la precisión y exactitud de los métodos al variar ciertas condiciones. Y es una forma de medir la robustez. Debido a esto no siempre se cita por separado y se incluye en la robustez.

Ejemplo 6. 10

Se proponen cambios en el método para extraer el principio activo (ibuprofen) en tabletas, para esto se proponen cambios en los factores de análisis, los valores nominales son las condiciones en las cuales se ha estado llevando a cabo el método.

Procedimiento.

1. Escribir los factores del análisis.
 - Numero de tabletas de mezclado A
 - Tiempo de mezclado B
 - Concentración del buffer C
 - Tiempo de extracción D
 - Tiempo de centrifugación E
 - Dilución F
 - Medición de longitud de onda G

2. Escribir en forma de columna los factores del análisis. (valores normales), las variaciones y el factor. Las variaciones son todos los cambios que se le aran al método.

Valores normales (factor) (nominales)	Variación (cambios en el método)
A:20 tabletas	a:10 tabletas A/a
B:15 minutos	b:10 minutos B/b
C:0.1 molar	c:0.2 molar C/c
D:20minutos	d:10 minutos D/d
E:5 minutos	e:3minutos E/e
F:5/50	f:2/25 F/f
G:263	g:265 G/g

3. Obtener la desviación estándar de los valores normales $S_{met} = 1.7$ (este valor se obtiene al realizar el método en condiciones normales, es decir a las condiciones de los valores nominales.)
4. Basándonos en las combinaciones de Youden se realiza el procedimiento con las correspondientes variaciones. Es decir se realiza el método 8 veces como indica la tabla siguiente y en cada vez se imponen las condiciones propuestas en la tabla.

Tabla 6.12 Combinaciones de Youden

factor	1	2	3	4	5	6	7	8
A/a	A	A	A	A	a	a	a	A
B/b	B	B	b	b	B	B	b	B
C/c	C	c	C	c	C	c	C	C
D/d	D	D	d	d	d	d	D	D
E/e	E	e	E	e	e	E	e	E
F/f	F	f	f	F	F	f	f	F
G/G	G	g	g	G	g	G	G	G
Resultados	s	t	u	v	w	x	y	Z
mg/tableta	85.7	87.28	92.28	91.28	90.42	88.57	88.42	89.14

La columna de resultados tiene todos los valores obtenidos al realizar el análisis a la misma muestra (en condiciones normales, columna 1 y en diferentes condiciones, como indican las demás columnas). En principio las cantidades deberían ser iguales sin embargo no es así y esto se debe a las variaciones en el método.

Ahora calcularemos las diferencias entre los valores obtenidos en condiciones normales y los obtenidos con las respectivas variaciones.

$$V_A = \frac{1}{4}(s+t+u+v) - \frac{1}{4}(w+x+y+z) = (A-a) = 0.0025 \quad (6.26)$$

$$V_B = \frac{1}{4}(s+t+w+x) - \frac{1}{4}(u+v+y+z) = (B-b) = -2.2875 \quad (6.26a)$$

$$V_C = \frac{1}{4}(s+u+w+y) - \frac{1}{4}(t+v+x+z) = (C-c) = 0.1375 \quad (6.26b)$$

$$V_D = \frac{1}{4}(s+t+y+z) - \frac{1}{4}(u+v+w+x) = (D-d) = -3.0025 \quad (6.26c)$$

$$V_E = \frac{1}{4}(s+u+x+z) - \frac{1}{4}(t+b+w+y) = (E-e) = -0.4275 \quad (6.26d)$$

$$V_F = \frac{1}{4}(s+v+w+z) - \frac{1}{4}(t+u+x+y) = (F-f) = -0.645 \quad (6.26e)$$

$$V_G = \frac{1}{4}(s+v+x+y) - \frac{1}{4}(t+u+w+z) = (G-g) = -1.2875 \quad (6.26f)$$

Los cálculos anteriores son para comparar los valores normales con la variación propuesta, se observa que existe mayor variación en (V_D) que es el tiempo de extracción y afecta en las variaciones que proponemos.

5. Calcular la S_{rob} de acuerdo con las siguientes ecuaciones:

$$\sum d^2_i = (A-a)^2 + (B-b)^2 + \dots + (G-g)^2 \text{ entonces}$$

$$S_{rob} = \sqrt{\frac{2}{7} \sum d^2_i} = \sqrt{\frac{2}{7} [(-0.0025)^2 + (-2.2875)^2 + \dots + (-1.2875)^2]} = 2.1452 \quad (6.27)$$

Criterio de aceptación⁽⁶⁾: $S_{rob} < S_{met} \ 2.1452 > 1.7$

Conclusión: no puede ser un método estándar a las condiciones propuestas. Como se observo el tiempo de extracción si influye, entonces no se considera en el calculo de la desviación estándar y se vuelve a determinar S_{rob} eliminando el valor de V_D y obteniéndose 1.46 y ahora si puede quedar como método estándar bajo las condiciones propuestas y claro sin considerar el tiempo de extracción (10 min). Lo anterior indica

que todas las variaciones son aceptables excepto la de el tiempo de extracción que deberá mantenerse en 20min.

6.10 CRITERIOS DE RECHAZO

Existen pruebas estadísticas que son capaces de confirmar un dato, aceptarlo o rechazarlo, porque se sospecha que se encuentra fuera de la línea y para comprobarlo se puede usar alguno de los siguientes métodos.

METODO DE DIXON

Se basa en aceptar o rechazar el dato mayor o menor de el conjunto.

1. Se ordena en forma creciente los valores.
2. Se selecciona el valor máximo y el valor mínimo.
3. Se busca el valor de $t_{(n)}$ en la tabla 6.13 La tabla se usa tanto para el valor mas bajo como para el mas alto.
4. Calcular τ_{calc} y compararla con t_n con % de riesgo que se encuentra en tabla 2 del anexo.

El criterio de aceptación es el siguiente $\tau_{calc} \leq t_{10}$ (no se rechaza el dato por ejemplo t_{10})

Para el valor mas alto: se sospecha de X_n :

$$\tau_{calc} = \frac{(X_n - X_{n-1})}{(X_n - X_1)} \text{ para muestras entre 3 y 7}$$

Tabla 6.13 Metodo de Dixon

n	t	Si se sospecha de X_n	Si se sospecha de X_1
$3 \leq n \leq 7$	t_{10}	$(X_n - X_{n-1})(X_n - X_1)$	$(X_2 - X_1)(X_n - X)$
$8 \leq n \leq 10$	t_{11}	$(X_n - X_{n-1})(X_n - X_2)$	$(X_2 - X_1)(X_{n-1} - X)$
$11 \leq n \leq 13$	t_{21}	$(X_n - X_{n-2})(X_n - X_2)$	$(X_3 - X_1)(X_{n-1} - X)$
$14 \leq n \leq 25$	t_{22}	$(X_n - X_{n-2})(X_n - X_3)$	$(X_3 - X_1)(X_{n-2} - X)$

5. Corroborar si cumple con el criterio de aceptación:

$$\tau_{calc} \leq t_{10} \text{ no se rechaza el dato mas alto (por ejemplo con } t_{10})$$

Ahora para el valor mas bajo:

calcular τ_{calc} y compararla con t_n con % de riesgo que se encuentra en tabla 2 del anexo.

El criterio de aceptación es el siguiente $\tau_{calc} \leq t_{10}$ no se rechaza el dato (por ejemplo t_{10})

$$\text{Se sospecha de } X_1: \tau_{calc} = (X_2 - X_1) / (X_n - X_1)$$

Para muestras (n) entre 3 y 7. obtener el valor de t_{10}

Comprobar si cumple el criterio de aceptación buscar en tablas del anexo.

$$\tau_{calc} \leq t_{10} \text{ no se rechaza el dato mas bajo con } t_{10}.$$

Ejemplo 6.11

Dada la siguiente corrida de datos.

10.45, 10.47, 10.47, 10.48, 10.49, 10.50, 10.50, 10.52, 10.53, 10.58

determinar si se descarta el valor de 10.58

$$1. \text{ Calcular } \tau_{calc} \quad \tau_{calc} = \frac{10.58 - 10.53}{10.58 - 10.47} = 0.454$$

2. Obtener el valor de τ_{11} con 5% de riesgo en la tabla 2 del anexo. $\tau_{11} = 0.477$

3. Conclusión : no hay razón para rechazar el ultimo valor.

METODO DE GRUBBS

Se basa en rechazar o aceptar el ultimo o primer dato de las mediciones.

En las tablas del anexo encontramos los valores del método.

El criterio de aceptación es:

$$\tau_{calc} \leq \tau_{tabla} \quad \tau_{tabla} \text{ se obtiene de la tabla 1 del anexo con un 5\% de riesgo y un numero de valores n}$$

Para una serie de datos $X_1 < X_2 < X_3 < \dots < X_{N-1} < X_N$

para el valor mas alto: $\tau = \frac{(X_n - \bar{x})}{S}$ para el valor mas bajo $\tau = \frac{(\bar{x} - X_1)}{S}$ (6.28)

Ejemplo 6.12

Dada la siguiente corrida de datos:

10.45, 10.47, 10.47, 10.48, 10.49, 10.50, 10.50, 10.52, 10.53, 10.57

determinar si se descarta el ultimo valor.

1. Calcular la media y la desviación estándar: $\bar{X} = 10.499$ Y $S = 0.034$
2. Calcular $\tau_{calc} = \frac{10.57 - 10.498}{0.0349} = 2.063$
3. Comparar los valores: a 5 % de riesgo y $n = 10$ $\tau_{tabla} = 2.176$ (tabla 1 del anexo)
4. Conclusión: no hay razón para rechazar el ultimo valor.

6.11 ESPECIFICIDAD Y SELECTIVIDAD

La especificidad de un método puede influir mucho en la exactitud. Su evaluación es difícil. Un método es específico, si un sistema con varios componentes, solo da una señal para el componente que se mide. De esta manera las interferencias de los diversos componentes presentes en las muestras o en los reactivos pueden modificar la señal emitida por dicho componente.

Un método es selectivo, si en un sistema de numerosos componentes, proporciona una señal para alguno o algunos componentes, excluyendo a otros.

La especificidad y la selectividad se estudian mediante :

- El establecimiento de la función de calibración del componente que se mide.
- El estudio de los componentes que producen la misma reacción.
- El estudio separado de la sustancia por analizar a la que se le añaden sustancias interferentes.
- Influencia de diversos componentes presentes en las muestras analizadas.

En el caso de medicamentos o muestras biológicas puede tratarse de excipientes, plasma, suero etc.

La comparación de las funciones de calibración con soluciones patrón primarias y muestras diversas da una idea aproximada de la especificidad de un método.

Es importante comparar después la función de calibración del componente que se mide con las diversas soluciones primarias de los componentes de la muestra para medir la especificidad y la selectividad. La función de calibración, es igual a la razón intensidad de la señal / concentración. El método se considera específico, cuando la función aumenta para el único componente que se mide. Es selectivo, cuando el coeficiente aumenta para todos los componentes seleccionados, excluyendo a todos los demás.

Para estudiar la especificidad, hay que examinar un gran número de componentes, por lo tanto el estudio es pesado y complejo. La presencia de interferencias se demuestra por el método de sobrecargas, agregando sustancias interferentes en concentraciones diversas a la muestra que contiene el componente.

Estas evaluaciones se hacen en las soluciones primarias de los componentes o en mezclas de diversas muestras para verificar las modificaciones de la función de calibración.

La sobrecarga de una muestra permite calcular, más o menos la influencia de esas sustancias en la reacción y la medición.

OBSERVACIÓN

La especificidad y la selectividad de las pruebas deben estudiarse muy estrictamente en la fase de creación de un método.

La especificidad se puede controlar mediante.

- una etapa de extracción específica.
- Una técnica analítica (utilización de una separación cromatográfica y utilización de un detector específico)

6.12 RENDIMIENTO DE UNA EXTRACCIÓN

El estudio del rendimiento de la extracción es útil para probar las diferentes etapas de un método analítico.

Este estudio permite evaluar las pérdidas del componente que se mide durante una etapa de extracción o separación. Esta etapa se debe mejorar al máximo cuando se optimiza un método.

El rendimiento de extracción se estudia sobre una escala de concentración de la sustancia que se analiza porque la eficacia de la extracción puede ser función de la concentración.

Este estudio se realiza en muestras de blanco sobrecargadas con cantidades crecientes y conocidas de la sustancia.

Existen muchos modelos en química analítica que se pueden aplicar para poder establecer las condiciones óptimas de separación. (estos métodos incluye el uso de diagramas de zonas de predominio, uso de agentes extractantes e intercambio de partículas, pH etc.)

6.13 COMPARACIÓN DE ALGUNOS METODOS DE VALIDACIÓN

REQUERIMIENTOS DE LA UNION EUROPEA.

Los requerimientos están dados en el anexo de la directiva⁽⁶⁾ y son los siguientes.

1. Los métodos de análisis los cuales se consideran para adopción de la directiva deberán ser examinadas respecto a los siguientes criterios:
 - 1.1 Especificidad
 - 1.2 Exactitud
 - 1.3 Precisión; repetibilidad intra laboratorio (dentro del laboratorio), reproducibilidad inter laboratorio (en el laboratorio y entre laboratorios).
 - 1.4 Limite de detección.
 - 1.5 Sensibilidad.
 - 1.6 Practicabilidad y aplicabilidad en condiciones normales de laboratorio.
 - 1.7 Otros criterios que pueden ser seleccionados como requisito.
2. La precisión de valores referidos al punto 1.3 deberán ser obtenidos de un ensayo colaborativo (colaborative trial) el cual ha sido conducido en concordancia con un protocolo internacional reconocido en ensayos colaborativos. (por ejemplo la *International Organisation for Standardisation Precision of test Methods ISO 5725/1981*⁽⁵⁾, la repetibilidad y la reproducibilidad deberán ser expresados en formas

estándar (e.g. intervalos de confianza al 95%, definidos por ISO 5725/1981) los resultados del ensayo colaborativo deberán ser publicados y estar disponibles.

3. Los métodos de análisis que son aplicables uniformemente a varios grupos de publicaciones deberán estar dados preferentemente sobre métodos que aplican publicaciones individuales.
4. Los métodos de análisis adoptados sobre esta directiva deberán ser en editados en esquemas estándares para métodos de análisis recomendados por la ISO.

REQUERIMIENTOS DE LA IUPAC (IN HOUSE METHODS VALIDATION)

Los requerimientos para la validación de un método, desarrollado en el laboratorio según la IUPAC son:

- 1 Introducción
- 2 Definiciones y terminología usada
- 3 Conceptos y principios generales
- 4 Introducción a los nuevos, o poco familiares métodos en el mismo laboratorio.
- 5 Parámetros requeridos:
 - Aplicabilidad
 - Selectividad
 - Calibración
 - Exactitud
 - Precisión
 - Rango
 - Limite de cuantificación
 - Limite de detección
 - Sensibilidad
 - Robustez o Ruggedness
 - Practicabilidad
5. Conclusiones
6. Recomendaciones
7. Referencias.

Otro planteamiento de la *Dutch Board for Accreditation* establece tres tipos de métodos generales; métodos nuevos, estándares o modificados. Y plantea un mayor número de requerimientos de validación para el primero, esto se puede observar en la figura 6.5. Y también plantea otros tres métodos generales que son cualitativos, cuantitativos y para determinación de trazas, planteando un número mayor de parámetros en importancia para validar un método de análisis de trazas de analito, también se puede ver en la figura.⁽¹³⁾

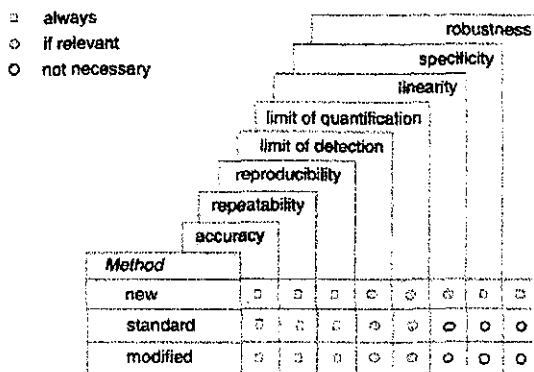


Figura 6.5

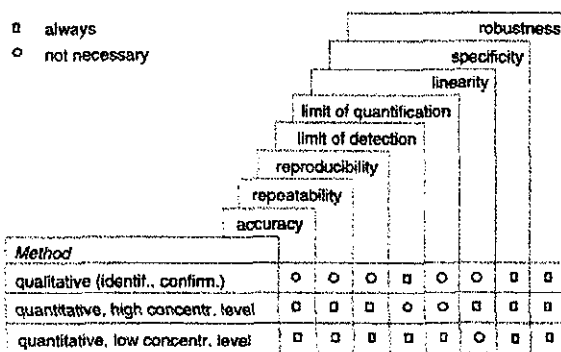


Figura 6.7

En recientes revisiones se discuten diferentes formas de validar métodos analíticos. Se han identificado algunas limitaciones en diferentes métodos de validación, tales como insuficiente seguimiento de la variabilidad en espacio y tiempo y discrepancias entre los



criterios de validación y se ha intentado usar el método de control regulatorio. Se ha hecho un esfuerzo por ligar los conceptos de validación usados en diferentes campos tales como medición de incertidumbres y predicción de errores. Se deberá tratar de establecer un modelo estadístico general disponible para combinar diferentes aspectos de validación.

6.14 SOLUCIONES ESTANDAR Y REACTIVOS DE REFERENCIA

Los reactivos son compuestos químicos que se emplean para hacer síntesis, reacciones de identificación y análisis cuantitativos.

Del grado de pureza de los reactivos depende su utilización. La purificación de los reactivos es cada vez más importante en las técnicas analíticas modernas. La elección de los reactivos dependerá de su uso final. La calidad en % de constitución química varía de 95% para la calidad técnica a 99.9% o más para la calidad necesaria en análisis cualitativos y cuantitativos muy precisos. La elección del reactivo debe tener en cuenta el costo con respecto a su uso. Así para el ácido sulfúrico común para análisis y para el ácido sulfúrico de poco contenido de contaminantes (metales pesados y otros), la relación de precio va de 1 a 18, el primero se utiliza para la síntesis y determinaciones acidimétricas comunes como reactivo de identificación y el último se escoge para preparar soluciones patrón en espectrofotometría de absorción atómica.

Los reactivos se distribuyen en varias categorías y su denominación varía según los proveedores.

Los reactivos del tipo técnico, se emplean en las síntesis minerales y orgánicas; los productos de estas síntesis se purifican después según protocolos específicos.

Los reactivos de calidad para análisis tienen características de pureza suficientes para cumplir con las exigencias de los organismos de estandarización. Los reactivos, las soluciones patrón y las soluciones amortiguadoras se pueden revisar en muchas fuentes tales como la farmacopea o la *AOAC INTERNATIONAL 2000 (Apéndice A: Standard Solutions and Reference Materials)*, en este apéndice se muestran los métodos oficiales para estas soluciones, por ejemplo:

- *AOAC Oficial Method 942.25 Standard Solution and Materials.*

- AOAC Oficial Method 942.26 Standard Solutions of Ammonium and Potassium Thiocyanate.
- AOAC Oficial Method 939.12 Standard Solutions of Arsenius Oxide.
- AOAC Oficial Method 964.24 Buffer Solutions for Calibration of pH equipment.

6.14.1 PRECISION Y ESTABILIDAD DE LAS SOLUCIONES TITULADAS.

En las paginas siguientes mostramos técnicas que permiten calibrar las soluciones tituladas en el laboratorio. Los títulos a determinar están sujetos a cierto error intrínseco. Este error depende de:

- La persona que efectúa el análisis.
- El instrumental de vidrio que se use.
- La pureza del reactivo que se utilice.

Al calcular la normalidad o titulo de una solución de ácido clorhídrico titulado con KHCO_3 así como la incertidumbre correspondiente:

a) calculo de la normalidad:

$$V_{\text{HCl}} = 17\text{ml} \quad \text{incertidumbre } \Delta_V = 0.05\text{ml}$$

$$\text{Pesada de } \text{KHCO}_3 = 200\text{mg} \quad \text{incertidumbre } \Delta_m = 0.1\text{mg}$$

$$PM_{\text{KHCO}_3} = 100$$

$$\text{La normalidad es } N_{\text{HCl}} = \frac{\text{Pesada}}{V_{\text{HCl}} \times PM_{\text{KHCO}_3}} = \frac{200}{100 \times 17} = 0.117647$$

b) la expresión correcta del error relativo es:

$$\frac{\Delta N_{\text{HCl}}}{N_{\text{HCl}}} = \frac{\Delta_M}{\text{Pesada}} + \frac{\Delta_V}{V_{\text{HCl}}} = \frac{0.1}{200} + \frac{0.05}{17} = 3.44 \times 10^{-3}$$

Por convención el numero de cifras significativas que se toman en cuenta para expresar el titulo es igual a la cifra del exponente del error relativo que es el que acabamos de calcular.

$$\text{En el titulo se toman cuatro cifras } N_{\text{HCl}} = 0.1176$$

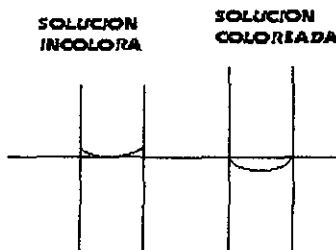
$$\text{Precisión: } N_{\text{HCl}} = 0.1176 \times \frac{\Delta N_{\text{HCl}}}{N_{\text{HCl}}} = 0.1176 \times 3.44 \times 10^{-3} = 4 \times 10^{-4}$$

$$\text{La expresión final y correcta del titulo es: } N_{\text{HCl}} = 0.1176 \pm 0.0004N$$

6.14.2 RECOMENDACIONES PARA CALIBRAR SOLUCIONES

LECTURA DE MENISCOS

Figura 6.8



Hacer dos determinaciones sistemáticamente cuando el protocolo no se describa completamente en el método.

Respetar escrupulosamente la cantidad de muestra que se indica, ya que su disminución aumenta el error.

Con el fin de disminuir el error debido al volumen, las cantidades de muestra se calculan para obtener un volumen de reactivo gastado de:

- 8 a 9 ml para una bureta de 10 ml.
- 10 a 14 ml para una bureta de 15 ml.
- 21 a 23 ml para una de 25 ml.

Para cada calibración se calcula el error absoluto con respecto al título o normalidad (ΔN) y se debe comparar con la monografía correspondiente. Cuando se efectúan dos determinaciones no deben obtenerse valores diferentes de ΔN , de ser el caso, existe un error de manipulación y se deben volver a hacer las determinaciones.

CASO PARTICULAR

(Calibración de soluciones tituladas con ayuda de una solución patrón primaria)

La calibración de CuSO_4 0.1N / I_2 0.1N / SCN^- 0.1 N corresponde a este caso. Estas tres soluciones se titulan con ayuda de una solución patrón primaria que es respectivamente EDTA 0.05M / $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0.1N / AgNO_3 0.1N.

En la precisión del título (ΔN) las soluciones de yodo, tiocianato y cobre interviene la correspondiente al título de la solución patrón primaria.

Por el contrario la variabilidad entre las dos determinaciones es independiente de la solución primaria que se utiliza.

Solo intervienen el error de la cantidad de muestra de la solución patrón primaria y el de la cantidad de muestra de la solución titulada que sale de la bureta.

Los títulos deben expresarse con:

- 4 cifras significativas para las soluciones de concentración mayor o igual a 0.1N : 0.10004
- 3 cifras significativas para las soluciones menores de 0.1N : 0.099

BURETAS

Las buretas de alta precisión se calibran individualmente por pesada y se entregan con un boletín de control individual (certificado de calibración). En el cuerpo del instrumento se graba el numero de control del certificado de calibración y el tiempo de escurrimiento.

Tabla 6.13 Precisiones.

Volumen	Δv (error absoluto)
15 cm ³	0.05cm ³
25 cm ³	0.05 cm ³
Menisco inicial (0) + lectura final	

PIPETAS.

El volumen nominal de cada pipeta se determina por pesada minuciosa e individual. Sobre la pipeta se graba un numero de matricula. Esta se acompaña de un certificado de calibración.

La calibración se efectúa a una temperatura ambiente de 20°C para cada categoría de precisión escrita.

En el apéndice A de *la AOAC INTERNATIONAL* viene una tabla de correcciones de volumen en soluciones acuosas para diferentes temperaturas.

Tabla 6.14 Precisiones.

Volumen	D _v (incertidumbre)
5 cm ³	0.009cm ³
10 cm ³	0.012cm ³
20 cm ³	0.018cm ³

La mayoría de las soluciones valoradas pueden durar hasta 3 meses a excepción de algunas, sin embargo se tienen que estar valorando si no se usan muy periódicamente.

6.15 MUESTREO

La calidad de los datos analíticos depende estrechamente de la validación de las muestras o de la exactitud del procedimiento de muestreo.

Es importante hacer un muestreo para el conjunto de pruebas: se debe disponer de una población homogénea para todo el estudio (determinación de los criterios de confiabilidad del método). El muestreo debe situarse en la zona de los valores determinados por el método.⁽¹⁰⁾

DEFINICIÓN

Muestreo es el proceso de seleccionar un conjunto de elementos representativos de una población. Este conjunto de elementos o muestra provee información referente a las características de la población. En análisis químico nos referiremos a una muestra como un conjunto de productos o materiales que fueron extraídos de un lote o fuente por medio de un método específico. Mas químicamente podemos decir que es una parte representativa de una matriz que puede ser compleja y que además esta parte tiene todas las propiedades y características de la matriz original.

Esta definición indica las implicaciones que se tienen que considerar antes de tomar una muestra o diseñar un proceso de muestreo. Esto es responsabilidad del químico, a través de discusiones con colegas, establecer la naturaleza real del problema.

TIPOS DE MUESTRAS

Las muestras se pueden clasificar de acuerdo a una gran variedad de criterios por ejemplo de acuerdo a sus propiedades físicas y químicas, o de acuerdo al plan de muestreo usado. Nos enfocaremos mas al segundo criterio.

MUESTRAS REPRESENTATIVAS

Al hablar de representatividad nos referimos a que la muestra debe tener propiedades y composición características de toda la población. Pero que pasa cuando la población es homogénea y cuando es heterogénea. El primer caso no tiene ningún problema, sin embargo el segundo si. En el segundo caso se debe establecer bien un método de extracción de muestra de tal manera que las características de esta sean representativas de toda la población una forma es que los elementos de la muestra se obtengan de manera aleatoria, para esto existen una gran cantidad de métodos estadísticos en los cuales no profundizaremos.⁽¹¹⁾

MUESTRAS SELECTIVAS

Son muestras que fueron deliberadamente escogidas por un plan de muestreo tales muestras presentan ciertas características y/o se selecciona un material con ciertas características a esto se le puede llamar también muestreo enfocado. Pero en donde se deben tomar estas muestras.

Tu puedes haber escogido un caso donde haya sospecha de contaminación. En análisis de alimentos por ejemplo si se tiene la sospecha de adulteramiento. Otros ejemplos son emisiones de gases o residuos peligrosos.⁽¹¹⁾

MUESTREO ALEATORIO

Una muestra seleccionada por un proceso aleatorio elimina los prejuicios de selección y provee las bases para la interpretación estadística de los datos. Existen tres tipos de muestreo aleatorio que son:

- 1) Muestreo aleatorio simple: todos los elementos de la población tienen la misma posibilidad de ser escogidos.
- 2) Muestreo aleatorio estratificado: la población es subdividida en estratos y se hace un muestreo aleatorio simple a cada estrato.
- 3) Muestreo sistemático: la primera muestra es seleccionada al azar, y entonces las siguientes muestras son seleccionadas de acuerdo a un intervalo por ejemplo cada 5 o 10 días.

MUESTRAS COMPUESTAS

La composición de la muestra es una forma de reducir el costo de analizar un gran número de muestras. La composición de la muestra consiste en dos o más porciones de material (recolectado en algún tiempo) seleccionados para que representen el material a investigar. La proporción de componentes tomados para hacer la muestra puede ser en términos de volumen, tiempo o flujo.

Los componentes de la muestra son tomados en proporción del material que la representa. Este tipo de muestra puede ser apropiada cuando se está analizando alimentos.

CALIDAD DE LA MUESTRA

Propiedades del analito tales como volatilidad, sensibilidad a la luz, estabilidad térmica y reactividad química, todas tienen que ser consideradas en la estrategia de muestreo. Estos factores necesitan ser tomados en cuenta para asegurarse de la calidad de la muestra, para que no se degrade antes de hacer el análisis. El contenedor de la muestra debe ser el adecuado para prever las situaciones anteriores.

6.16 GRAFICAS DE CONTROL.

La validez de las mediciones de rutina, puede ser evaluada y controlada por repetidos análisis de control de muestras. Los resultados son monitoreados en un gráfico de control,

con límites de control establecidos. Estos gráficos proveen información sobre la estabilidad de largos procesos o bien información en base a especificaciones.

Con frecuencia surge la necesidad de controlar periódicamente la fabricación de un producto, quizás para observar si los artículos individuales contienen en promedio, la cantidad correcta de una sustancia dada y para asegurar que no existe demasiada variación. Una forma de hacerlo es tomando pequeñas muestras a intervalos regulares.

Un diagrama de control es una grafica en la que se presentan consecutivamente los valores de las medias muestrales de manera que se pueda tomar cualquier acción correctora lo mas rápido posible.

CONSTRUCCIÓN

- Comúnmente se requieren por lo menos 100 muestras extraídas del proceso.
- Se dividen los datos en subgrupos de 20 o 25.
- Construya una tabla de tal manera que sea fácil calcular la media y el rango de los valores. Para calcular la media y el rango se usan las siguientes formulas.

$$n = (\text{tamaño del subgrupo})$$

$$k = (\text{numero de subgrupos})$$

- calcular la media y el rango de cada subgrupo.

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} \quad R = X_{\max} - X_{\min} \quad (6.29)$$

- Calcular la media general o la gran media y el rango promedio de acuerdo a:

$$\bar{\bar{X}} = \frac{\sum_{i=1}^k \bar{X}_i}{k} \quad \bar{R} = \frac{\sum_{i=1}^k R_i}{k} \quad (6.30)$$

- Calcule la línea central y los límites de control, usando los coeficientes A_2, D_4, D_3 , etc. Del anexo.

Grafico de control \bar{X}

Grafico de control R

$$\begin{array}{ll}
 LC = \bar{\bar{X}} & LC = \bar{R} \\
 LSC = \bar{\bar{X}} + A_2 \bar{R} & LSC = D_4 \bar{R} \\
 LIC = \bar{\bar{X}} - A_2 \bar{R} & LIC = D_3 \bar{R}
 \end{array} \tag{6.31}$$

- Construya el gráfico de control para medias y rangos marcando la línea central y los límites inferior y superior de acuerdo con la figura 6.7

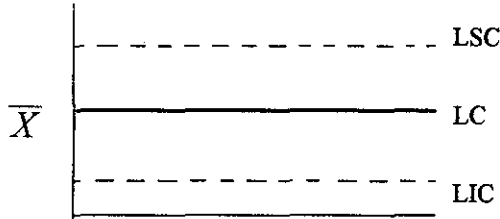


Figura 6.9

6.16.1 INTERPRETACIÓN

Como el objetivo de la construcción de un gráfico de control es observar los cambios que ocurren en el proceso con fines de control o corrección de anomalías. Debemos establecer los criterios de evaluación de estas.

- Todos los puntos deben caer dentro de los límites de control.
- Los grupos no se agrupan de una forma en particular.

Las anomalías son que:

- Que haya puntos fuera de los límites de control.
- Los puntos adquieren una forma particular aunque estén dentro de los límites.

Tales formas pueden ser.

- **Ciclos:** cuando un conjunto de puntos se alinea a un lado de la línea central, la cantidad de puntos que lo constituyen se llama longitud del ciclo. Si hay un ciclo de 7 puntos o más se considera una anomalía.

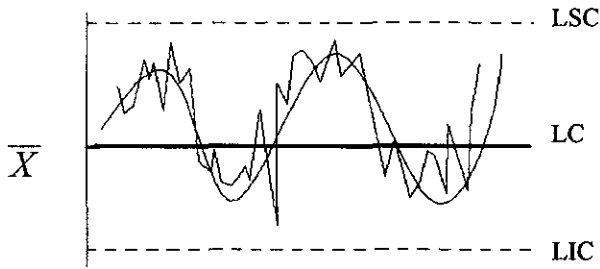


Figura 6.10

- **Tendencias:** se verifica cuando hay un ascenso o descenso continuo de puntos y se considera anomalía si 7 puntos al menos hacen o descienden de manera consecutiva. Sin embargo también puede ocurrir que los puntos sobrepasen los límites de control antes de llegar a 7.

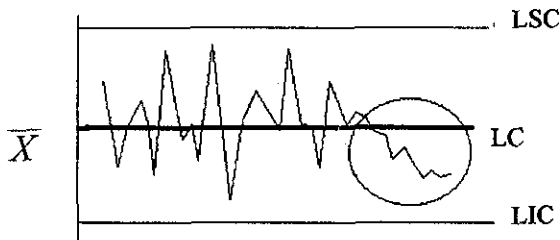


Figura 6.11

- **Periodicidad:** si los puntos presentan la misma pauta de variación a lo largo de intervalos iguales diremos que existe periodicidad. La única manera de identificarla es seguir el movimiento de los puntos y adoptar una decisión técnica.
- **Adherencia a la línea de control:** ocurre cuando todos los puntos están adheridos a la línea central. Probablemente se haya mezclado en el subgrupo distintos datos o datos de factores diferentes, en este caso es necesario cambiar el subagrupamiento, reunir otra vez los datos y trazar el gráfico.

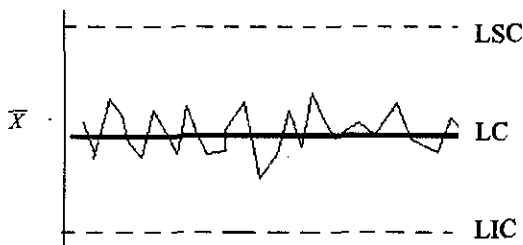


Figura 6.12

- **Comparación con las especificaciones:** Los límites de especificación siempre están determinados por los requerimientos de los clientes, y no siempre los límites que establecemos son los correctos, es decir puede no haber ningún punto fuera de los límites, sin embargo pueden existir productos que no cumplen con la especificación. En este caso se deben reducir los límites.

Existen una gran diversidad de modalidades de gráficos de control, esas se pueden consultar en libros de control de calidad.



CURVAS DE CALIBRACIÓN

7.1 ANALISIS INSTRUMENTAL

Las técnicas clásicas de análisis (vía húmeda) como volumetrías, gravimetrías, se utilizan todavía en muchos laboratorios. Estas técnicas suministran buenas introducciones a la manipulación y otras practicas requeridas en el trabajo analítico. Sin embargo en este momento no hay duda de que muchos análisis se efectúan por métodos instrumentales. Las técnicas que utilizan espectrometría de absorción y emisión a varias longitudes de onda, diferentes métodos electroquímicos, espectrometría de masas, cromatografía gaseosa y de líquidos, medios radioquímicos y térmicos ocupan un porcentaje alto de los métodos mas usados.

Los métodos instrumentales pueden realizar análisis muy complicados o imposibles por los métodos clásicos. Puesto que estos pueden detectar especies químicas en submicrogramos y son sorprendentemente sensibles.

La relación que tienen los métodos instrumentales con las curvas de calibración es muy importante debido a que en el uso de estos métodos siempre será necesario utilizar una curva de calibración, la cual puede ser de diversas formas, casi siempre dependiendo de las propiedades del analito que se desee analizar.

Las curvas de calibración mas comunes son las que relacionan la concentración con la absorbancia y que son muy importantes en diversas áreas del análisis químico, pero principalmente en el análisis farmacéutico, aunque claro, también existen otras propiedades importantes como conductividad, fluorescencia, potencial, etc.

En el capitulo anterior ya discutimos la definición de las curvas de calibración, ahora las veremos detalladamente.

Antes de iniciar es importante tener claro que cuando nos referimos a la propiedad del analito, del estándar o del valorante (en caso de las curvas de valoración) nos estamos refiriendo a cualquiera de las propiedades mencionadas en la sección 7.1

Las principales curvas de calibración se pueden clasificar de la siguiente manera:

Curvas de calibración	Directas e indirectas, con dilución sin dilución,
Curvas de adiciones patrón	Directas e indirectas, con dilución sin dilución
Curvas de valoración	Directas e indirectas, con dilución sin dilución.

7.2 CURVAS DE CALIBRACIÓN DIRECTAS SIN DILUCION

La propiedad (área, absorbancia, conductividad etc.) esta dada directamente por el analito sin que haya reacción química.

Definiremos las siguientes variables:

C_s = concentración de estándar.

V_s = volumen inicial de estándar.

En este caso el sistema blanco contiene todo excepto el analito.

$$\text{Ecuaciones } P_x = k_x \left[\frac{V_s C_s}{V_t} \right] \quad (7.1)$$

$$C_x = \frac{V_s C_s}{V_t}$$

Para obtener la concentración del problema solo se sustituye $V_s C_s$ por $V_p C_p$ en ecuación 7.1

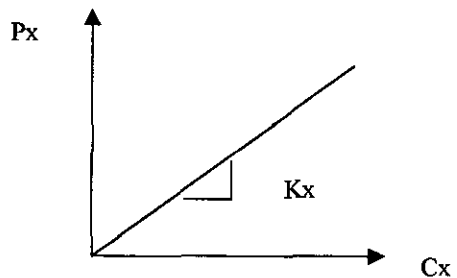
V_t = volumen de aforo o volumen total.

P_x = propiedad medida por el equipo del analito X.

C_x = concentración ajustada = $V_s C_s / V_t$

K_x = constante característica del analito.

C_p y V_p son la concentración y volumen del problema.



Grafica 7.1

Para obtener la concentración de analito problema solo se interpola la propiedad medida de este en las mismas condiciones que los estándares, se obtiene la concentración $C_x =$

concentración de problema sin corregir, se sustituye en ecuación 6.24 y se despeja V_p que pasaría a ser la concentración del analito problema.

7.3 CURVAS DE CALIBRACIÓN DIRECTAS CON DILUCIÓN

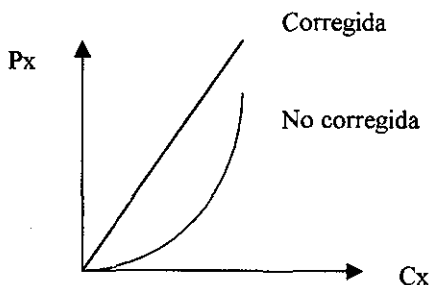
En este caso los volúmenes de todos los sistemas son diferentes y se tiene que hacer una corrección por dilución para obtener una curva similar a la de la grafica 6.3. En este caso incluiremos en el factor de dilución la variable V_a que es el volumen agregado que puede ser de disolvente o alguna otra solución (amortiguador).

Corrección por dilución para estándar y problema.

$$\frac{V_s + V_a}{V_s} \left[P_x = k_x \left[\frac{V_s C_s}{V_s + V_a} \right] \right] \quad (7.2)$$

$$\frac{V_p + V_a}{V_p} \left[P_x = k_x \left[\frac{V_p C_p}{V_p + V_a} \right] \right] \quad (7.2a)$$

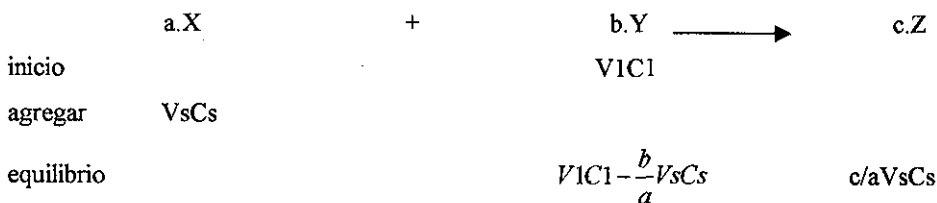
Se corrigen todos los valores obtenidos de la propiedad y se hace lo mismo que en el caso anterior.



Grafica 7.2

7.4 CURVAS DE CALIBRACIÓN INDIRECTAS SIN DILUCIÓN

En este tipo de curvas, interviene una reacción química cuya constante de equilibrio es mucho mayor de 1, no son curvas de valoración, pero el analito no puede dar la propiedad por si solo. (En este caso $V_1 C_1$ es el volumen y concentración de reactivo Y)



Caso I Z da la propiedad:

$$P_z = k_z \frac{c}{a} \left[\frac{V_s C_s}{V_t} \right] \quad (7.3) \text{ el grafico parte}$$

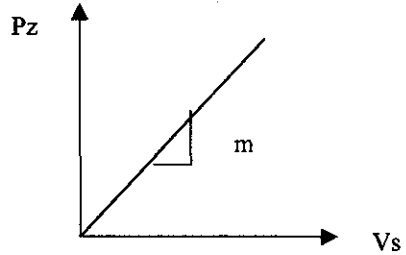
de cero y tiene una pendiente $m = \frac{c/a C_s}{V_t}$

problema. Y son diferentes en cada sistema o punto de la curva.

donde C_s y V_s son la concentración y el volumen tanto de estándar como de problema.

En el caso del sistema problema:

$$P_z = K_z \frac{c}{a} \left[\frac{V_p C_p}{V_t} \right] \quad (7.3a)$$



Grafica 7.3

Caso II Y da la propiedad:

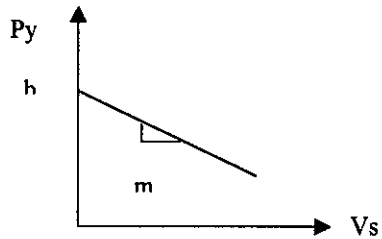
$$P_y = k_y \left[\frac{V_1 C_1 - b/a V_s C_s}{V_t} \right] \quad (7.4)$$

esto da una ecuación de la forma $Y = b + m.X$

$$b = \frac{k_y V_1 C_1}{V_t} \quad \text{y} \quad m = \frac{-b/a C_s}{V_t}$$

en el caso del sistema problema:

$$P_y = k_y \left[\frac{V_1 C_1 - b/a V_p C_p}{V_t} \right] \quad (7.4a)$$



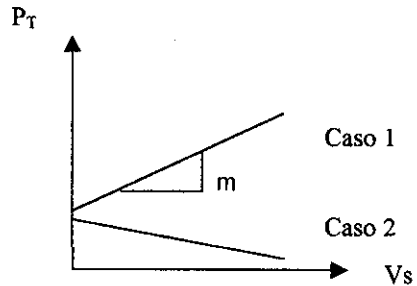
Grafica 7.4

Caso III Y y Z dan la propiedad: En este caso la propiedad es aditiva

$P_T = P_y + P_z$ en donde las dos ecuaciones anteriores se suman, obteniendo dos casos mas dependiendo del valor de K_y y K_z . (7.5)

$$P_T = \frac{k_y V_1 C_1}{V_t} + \left[k_z c/a - k_y b/a \right] \frac{V_s C_s}{V_t}$$

Caso 1 $k_z c/a > k_y b/a$ y caso 2 $k_y b/a > k_z c/a$



Grafica 7.5

En el caso de las curvas de calibración indirectas con dilución se usa el mismo modelo anterior, únicamente, se multiplican todos los sistemas por el factor de dilución.

7.5 CURVAS DE ADICIONES PATRON DIRECTAS SIN DILUCIÓN.

En este tipo de curvas siempre esta presente el problema, y el estándar esta también en todos los sistemas excepto en uno.

En esta curva definiremos las variables :

- Vp = volumen de solución problema
- Cp = concentración de la solución problema
- Vs y Cs son volumen y concentración de estándar

$$V_t = V_s + V_p + V_a$$

Va = volumen agregado de disolvente.

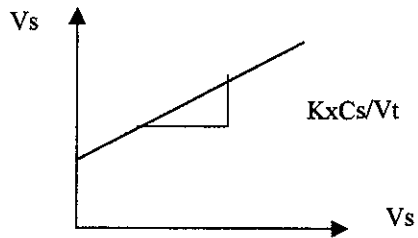
Vsp = volumen de estándar mas volumen de problema

Entonces la concentración total del

$$\text{analito } C_x = C_s + C_p$$

(7.6)

$$P_x = k_c \left[\frac{V_p C_p + V_s C_s}{V_t} \right] = \frac{k_c V_p C_p}{V_t} + \frac{k_c C_s}{V_t} V_s$$



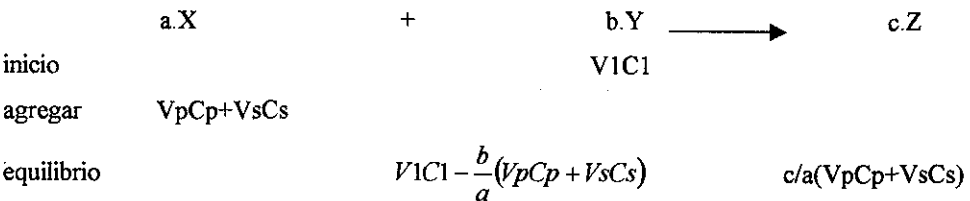
Grafica 7.6

Para las curvas con dilución se multiplica el valor de la propiedad por el factor:

$$(V_{sp} + V_a)/V_{sp}$$

7.6 CURVAS DE ADICIONES PATRON INDITRECTAS SIN DILUCIÓN

Involucra reacción química y existen tres casos:



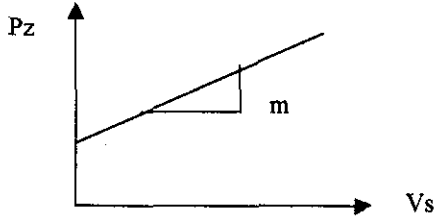
Caso I Z da la propiedad:

$$P_z = K_z \left[\frac{c/aV_pC_p + V_sC_s}{V_t} \right] \Rightarrow \left(P_z = \frac{K_z b/aV_pC_p}{V_t} + \frac{K_z c/aV_sC_s}{V_t} \right) \quad (7.7)$$

$$P_z = \frac{K_z c/aV_pC_p}{V_t} + \frac{K_z c/aC_s}{V_t} V_s \quad (7.7a)$$

Donde $m = \frac{k_z c/aC_s}{V_t}$ y

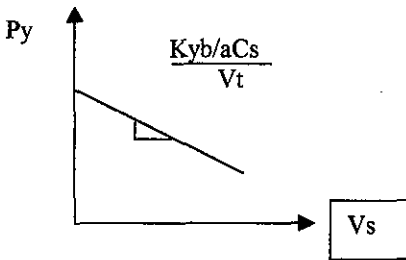
$$b = \frac{k_z c/aV_pC_p}{V_t}$$



Gráfica 7.7

Caso 2 Y da la propiedad

$$\left(P_y = k_y \left[\frac{V_1C_1 - b/a(V_pC_p + V_sC_s)}{V_t} \right] \right) \Rightarrow P_y = \frac{V_1C_1}{V_t} - \frac{k_y b/aV_pC_p}{V_t} - \frac{k_y b/aC_s}{V_t} V_s \quad (7.8)$$



Gráfica 7.8

Caso 3 cuando Y y Z dan la propiedad el caso es similar a las curvas de calibración, solo varía la pendiente de acuerdo al valor de las constantes k_y y k_z .

En el caso de curvas adiciones patrón indirectas con dilución, solo se multiplican las ecuaciones por el factor de dilución $(V_{sp} + V_a)/V_{sp}$.

7.7 CURVAS DE VALORACIÓN

En las curvas de valoración siempre hay asociada una reacción química, en donde se sigue una reacción de valoración midiendo una propiedad, la cual es aditiva cuando la producen mas de una especie química.

Definiremos las siguientes variables:
 V_x = volumen de alícuota solución problema
 PE = punto de equivalencia.

C_x = concentración solución problema
 V_y = volumen de valorante agregado
 C_y concentración de valorante
 VPE = volumen de punto de equivalencia

reaccion:	a.X	+	b.Y	→	c.Z
inicio	$V_x C_x$				
agregamos			$V_y C_y$		
APE	$V_x C_x - a/b V_y C_y$		ξ		$c/b V_y C_y$
PE	ξ		ξ		$c/b V_y C_y = c/a V_x C_x$
DPE	ξ		$V_y C_y = b/a V_x C_x$		//

$$P_T = P_X + P_y + P_z$$

Caso 1 $K_y = K_z = 0$

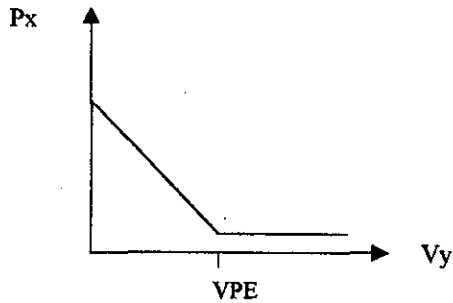
$$\text{APE } P_x = K_x \left(\frac{V_x C_x - a/b V_y C_y}{V_x + V_y} \right)$$

$$\text{DPE } P_x = K_x \left(\frac{\xi}{V_x + V_y} \right) \approx 0 \quad (7.9b)$$

multiplicando por factor de dilución
 $(V_x + V_y)/V_x$

$$P_x = K_x C_x - K_x a/b \frac{C_y}{V_x} V_y \quad (7.9)$$

$$\text{PE } P_x = K_x \left(\frac{\xi}{V_x + V_y} \right) \approx 0 \quad (7.9a)$$

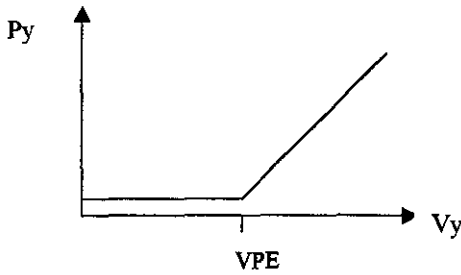


Gráfica 7.8

Caso 2 K_x y $K_z = 0$

APE Y PE $P_y = 0$

$$\text{DPE } P_y = k_y \left[\frac{V_y C_y - b/a V_x C_x}{V_x + V_y} \right] = -k_y b/a C_x + \frac{k_y C_y}{V_x} V_y \quad (7.10)$$



Grafica 7.9

Caso 3 $K_y, K_x = 0$

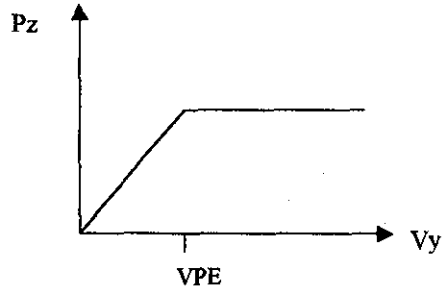
(7.11)

APE Y PE $P_z = kz \left[\frac{c/bV_y C_y}{V_x + V} \right]$

corrigiendo por dilución = $kzc/b \frac{C_y}{V_x} V_y$

DPE $P_z = Kz \left[\frac{c/aV_x C_x}{V_x + V_y} \right]$ corrigiendo

por dilución = $kzc/aC_x = \text{constante}$.



Grafica 7.10

Caso 4 X y Y dan la propiedad

$P_T = P_x + P_y$ donde P_y tiende a cero

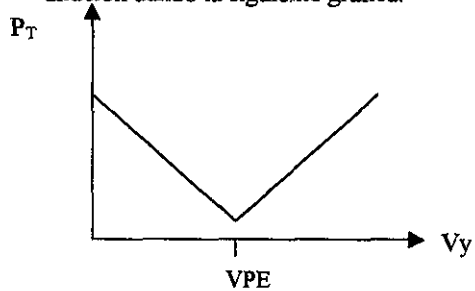
APE $P_r = kx \left[\frac{V_x C_x - a/bV_y C_y}{V_x + V_y} \right]$

PE $P_T =$ tiende a cero (7.12)

DPE $P_r = ky \left[\frac{V_y C_y - b/aV_x C_x}{V_x + V_y} \right] + P_x$

donde P_x tiende a cero.

Ambas ecuaciones se corrigen por dilución dando la siguiente grafica:



Grafica 7.11

Caso 5 X y Z dan la propiedad

$$P_T = P_X + P_Z$$

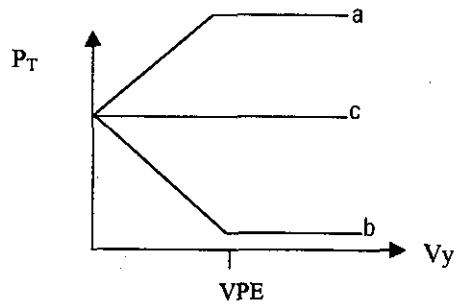
$$\text{APE } P_T = kx \left[\frac{V_x C_x - a/b V_y C_y}{V_x + V_y} \right] + kzc/b \left[\frac{V_y C_y}{V_x + V_y} \right] = kx C_x + \frac{V_y C_y}{V_x} [kzc/b - kxa/b]$$

$$\text{PE } P_T = P_X + kz \left[\frac{c/b V_y C_y}{V_x + V_y} \right] = kzc/b \frac{V_y C_y}{V_x} \quad (7.13) \quad \text{donde } P_x \text{ tiende a cero}$$

$$\text{DPE } P_T = P_X + kzc/a \frac{V_x C_x}{V_x + V_y} = kzc/a C_o$$

donde P_x tiende a cero.

- a) $kzc/b > kxa/b$
- b) $kxa/b > kzc/b$
- c) $kxa/b = kzc/b$



Grafica 7.12

Caso 6 Y y Z dan la propiedad.

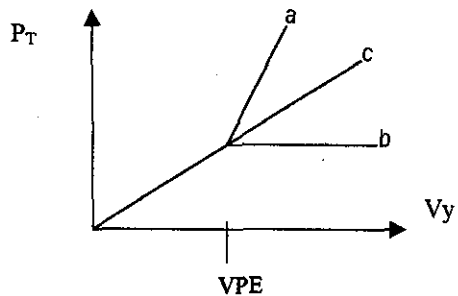
$$\text{APE } P_T = P_y + kz \left[\frac{c/b V_y C_y}{V_x + V_y} \right]$$

$$\text{PE } P_T = P_y + kz \left[\frac{c/b V_y C_y}{V_x + V_y} \right] \quad (7.14)$$

en ambos casos P_y tiende a cero.

$$\text{DPE } P_T = ky \left[\frac{V_y C_y - b/a V_x C_x}{V_x + V_y} \right] + kz \left[\frac{c/a V_x C_x}{V_x + V_y} \right]$$

- a) $kyb/a > kzc/a$
- b) $kzc/a > kyb/a$
- c) $kyb/a = kzc/a$



Grafica 7.13

Caso 7 X, Y y Z dan la propiedad.

$$P_T = P_X + P_y + P_Z$$

$$\text{APE } P_T = kx \left[\frac{V_x C_x - a/b V_y C_y}{V_x + V_y} \right] + P_y + kz \left[\frac{c/b V_y C_y}{V_x + V_y} \right]$$

cuando P_y tiende a cero y corrigiendo por dilución se tiene:

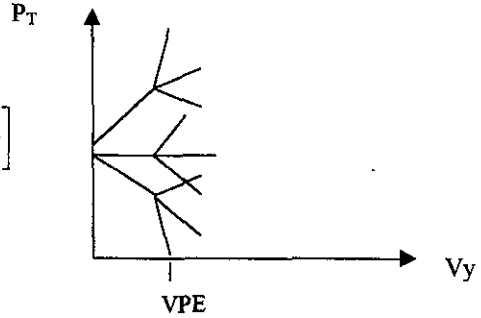
$$= kzCx + \frac{V_y C_y}{V_x} [kzc/b - kxa/b]$$

$$PE \quad P_T = kz \left[\frac{c/bV_y C_y}{V_x + V_y} \right] \quad (7.15)$$

$$DPE \quad P_T = ky \left[\frac{V_y C_y - b/aV_o C_o}{V_x + V_y} \right] + kz \left[\frac{c/aV_x C_x}{V_x + V_y} \right]$$

corrigiendo por dilución se tiene:

$$= \frac{kyV_y C_y}{V_x} + Cx [kzc/a - kyb/a]$$



Grafica 7.14

CURVAS DE VALORACIÓN DE MEZCLAS

Como sabemos las valoraciones espectrofotometricas son de gran importancia, estas han sido usadas durante mucho tiempo para determinar metales que forman complejos coloridos con algunos ligantes como EDTA. Ahora estableceremos un modelo para determinar dos metales, la condición para que se puedan valorar juntos es que tengan una K_{eq} diferente para formación de complejos con el valorante y además que el complejo formado con ambos metales tenga diferente constante de absorción o absortividad molar.

Un ejemplo muy común es la valoración de Bismuto y Cobre con EDTA (Y).

Reacción 1	Bi ⁴⁺	+	Y	→	BiY
Inicio	$V_o Co$		VC		
PE1	ξ		ξ		$V_o Co = VC$
Reacción 2	Cu ²⁺	+	Y	→	CuY
Continua	V_{IC1}				
APE2	$V_{IC1} - (VC - V_o Co)$		ξ		$VC - V_o Co$
PE2	ξ		ξ		$V_{IC1} = VC - V_o Co$
DPE2	ξ		$(VC - V_o Co) - V_{IC1}$		V_{IC1}

Si consideramos que solo el complejo CuY absorbe y que $K_{eq1} > K_{eq2}$ esperaríamos que la propiedad desde cero volumen hasta VPE1 vale cero y a partir de este volumen comienza a aumentar la propiedad debido a la absorción de CuY que se comienza a formar después de transcurrida la primera reacción. Las ecuaciones son:

0 hasta VPE1 $P = K_{BiY}(V_0Co/Vt)$ como

el complejo no absorbe $P = 0$

VPE1 hasta VPE2

$$P = K_{CuY} \left[\frac{VC - V_0Co}{Vt} \right] \quad (7.16)$$

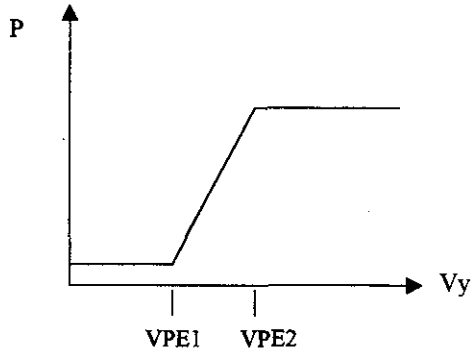
Es una recta con pendiente positiva.

DPE2 como solo el complejo con cobre

absorbe la propiedad se mantiene

constante en un valor de

$$P = K_{CuY}(VIC1/Vt)$$



Gráfica 7.15

**PROGRAMA DE VALIDACIÓN**

En este tema desarrollaremos toda la metodología que deberemos seguir para la implementación de un programa de validación, como ya vimos paso a paso la metodología para la validación de un método analítico, ahora veremos quien lo va a hacer.

Existe una gran diversidad de modalidades de realizar y poner en marcha el programa de validación.

8.1 PROGRAMA DE VALIDACIÓN EN EL LABORATORIO (IN-HOUSE VALIDATION)

Los programas de validación en el laboratorio son en realidad principios de validación que servirán como base para una validación mas completa. En principio una validación en el laboratorio no es suficiente para poder determinar la validez de un método, siempre será necesario un programa mas amplio, como los estudios interlaboratorios que se verán mas adelante. Sin embargo la validación en el laboratorio siempre será necesaria para iniciar un programa interlaboratorios. A continuación se verán algunos programas de este tipo.

8.2 PROGRAMA ZERO-BLIND

Este método involucra únicamente un analista, usando el método con muestras de concentraciones conocidas de analito y con esto demuestra todos los parámetros de confiabilidad ya vistos. Y el método es sometido a juicio del analista, y este determina si el método es rápido, simple, útil y este lleva los resultados subjetivos y determina de manera critica e imparcial si el método se debe usar o no.

Sin embargo como primera aproximación, y una demostración del potencial de validación requerirá de poco personal, muestras y costo. Un método zero-blind es una buena forma de

iniciar un proceso de validación. Obviamente si esta técnica falla en la validación, entonces se puede iniciar con el siguiente método que es:

8.3 PROGRAMA SINGLE-BLIND

Involucra un analista que prepara las muestras a varios niveles de concentración y a un segundo analista, quien analiza las muestras. Los resultados son entonces recopilados y comparados por el primer analista. Aunque esta técnica es imparcial al inicio pierde eficacia en el estado mas crucial cuando todas las corridas de datos son comparadas. Este método tiene mayor grado de confiabilidad puesto que involucra la discusión y revisión de resultados entre dos analistas. Este método es bueno para iniciar una validación y se recomienda recurrir a el cuando el primero no funcione.

8.4 PROGRAMA DOUBLE-BLIND

Este método involucra tres analistas. El primer analista prepara las muestras a niveles de concentración conocidos, el segundo realiza el análisis y el tercer analista (o administrador) compara ambas corridas de datos recibidos por separado de los dos primeros analistas. Ni el primero ni el segundo analista tienen acceso a los datos generados por cada uno.

8.5 VALIDACIÓN ATRAVEZ DE ESTUDIOS COLABORATIVOS (ESTUDIOS INTERLABORATORIOS)

Este método es quizás el mas aceptado, sobre todo para la validación de un método analítico nuevo. Consideraremos los criterios generales de la AOAC para la descripción de un programa de validación a través de estudios colaborativos.

La *AOAC INTERNATIONAL* Es la única organización científica no lucrativa que propuso por primera vez los estudios colaborativos para la validación de métodos, para su implantación en la industria y en laboratorios académicos. El programa de la AOAC fue designado para proveer métodos de análisis con características bien definidas tales como precisión, exactitud, sensibilidad, rango etc. Un prerrequisito de la AOAC para adoptar

métodos es la validación a través de un estudio inter laboratorio o colaborativo, en laboratorios independientes y en idénticas condiciones. Tales métodos validados pueden ser entonces usados con un alto grado de confiabilidad por organismos regulatorios, legislativos, laboratorios de prueba e instituciones académicas. Los métodos son usados para determinar la confiabilidad requeridos por los organismos legislativos, para mantener el control de calidad y procesar los requerimientos que evaluarán la confiabilidad en los diferentes laboratorios u organismos de su interés.

Un estudio de validación patrocinado por la AOAC empieza con la cita de un representante de la AOAC con el responsable de la organización del método en estudio.

El o ella selecciona, desarrolla o adopta el método que será estudiado. Entonces el representante desarrolla el protocolo para el estudio colaborativo y la validación en el laboratorio (*in house validation*) de acuerdo con las guías de la AOAC. El protocolo recomendado y los datos de la validación en el laboratorio serán revisados posteriormente por el representante, un comité estadístico, un comité de seguridad y un comité de métodos. Una vez que se ha revisado el protocolo y se ha aceptado se procede al estudio colaborativo. El representante reúne colaboradores en laboratorios con experiencia en el tipo de análisis requerido, en el método propuesto.

Para métodos cuantitativos se requerirán mínimo 8 laboratorios con un mínimo de 5 muestras. Y para métodos cualitativos un mínimo de 15 laboratorios, reportando dos niveles de analito por muestra, 5 replicas por nivel y 5 controles negativos.

El representante prepara el material de prueba, muestras y si requiere otros materiales, serán proporcionados también a los colaboradores tales como materiales de referencia, columnas empacadas y las formas e información necesaria para el reporte.

Se espera a que los colaboradores dirijan la prueba exactamente como fue estructurada, sin desviaciones y reporten los resultados.

8.6 REVISIONES DE EXPERTOS

El representante recopila los datos, evalúa los resultados y escribe el reporte del estudio colaborativo de acuerdo con los lineamientos de la AOAC. El reporte es remitido al

director general y al asesor estadístico, y al comité de métodos para hacer la revisión técnica.

Posteriormente ya que es aceptado, este método es publicado en la AOAC Official Methods.

8.6.1 METODOS NO PATROCINADOS POR LA AOAC

Los métodos que desarrollaron otras organizaciones y que siguieron el protocolo de la AOAC, pueden ser sometidos a revisión y adopción por la AOAC.

8.6.2 MODIFICACIONES DE LOS METODOS DE LA AOAC

Cuando es necesario hacer modificaciones en un método oficial de la AOAC el procedimiento y extensión de la validación dependen de una extensa revisión. Esta determinación será hecha por el director general y el comité de métodos.

8.7 COMITÉ ORGANIZACIONAL PARA EL ESTABLECIMIENTO Y VALIDACIÓN DE METODOS

El programa es administrado por expertos técnicos voluntarios citados por la AOAC. Los voluntarios son citados generalmente por término de 3 años. A estas personas se les denomina directiva de métodos oficiales.

La directiva de métodos oficiales consta de 10 comités los cuales tienen de 7 a 11 miembros. Cada uno de los comités dirige y supervisa el desarrollo y validación de los métodos analíticos y revisan protocolos para los estudios inter laboratorio. Todos los integrantes de los comités estudian diversas áreas de desarrollo. (alimentos, fertilizantes, drogas, medicamentos etc.)

Algunos científicos con experiencia pueden colaborar, estos son seleccionados por el organizador del estudio colaborativo, estos científicos pueden venir desde universidades, laboratorios comerciales u organismos regulatorios.

Los miembros del comité de seguridad deberán revisar los aspectos de seguridad e higiene y promoverlos, apoyándose en otros organismos dedicados a la seguridad e higiene.

Comité estadístico: los miembros del comité desarrollan y recomiendan guías estándares en las cuales se encuentran todos los métodos estadísticos pertinentes para la validación.

Los laboratorios invitados a participar deberán tener experiencia en las técnicas empleadas. Se puede desarrollar una lista de posibles participantes a través del personal, contactos y sociedades técnicas.

En el apéndice D de la *AOAC INTERNATIONAL* 2000, aparece una lista de guías y procedimientos respecto a estudios colaborativos. (*Guidelines for Collaborative Study Procedures to Validate Characteristics of a Method of Analysis.*)⁽¹⁴⁾

8.8 VALIDACIÓN POR ANÁLISIS DE ESTANDARES DE REFERENCIA

El análisis de un estándar de referencia o una muestra de composición conocida es generalmente aceptado como método de validación. La USP, NIST y otras organizaciones privadas se especializan en preparar estándares garantizados de varios analitos y en diferentes matrices. Cuando se usa este método el analista debe demostrar que el método provee todos los parámetros de confiabilidad requeridos al analizar el estándar. Aunque este método no podría ser tan confiable ya que el analista conocería de antemano la concentración del estándar.

8.9 VALIDACIÓN POR COMPARACIÓN CON UN METODO ACEPTADO

Este método comúnmente es realizado por un solo analista, pero puede ser realizado por dos analistas. Esta técnica usa los resultados de métodos actuales y aceptados como verificación de los nuevos resultados obtenidos. Acuerdos entre resultados inicialmente sugieren la validación. Por el contrario los desacuerdos son una seria causa para preocuparse sobre la aceptabilidad del método.

Sin embargo desacuerdos también pueden sugerir que el método de comparación es invalido, creando adicionales problemas. Si el analista puede probar que el método es invalido entonces deberá proponer una alternativa de validación.⁽¹⁴⁾

8.10 REVALIDACIÓN

Después de que un método ha sido validado, este puede ser transferido a otros laboratorios que pueden requerir de este. Idealmente los laboratorios están en constante comunicación para que todas las metas de desarrollo, optimización y validación se alcancen de la mejor manera.

La documentación del método debe incluir un procedimiento escrito detallado del reporte del método de validación, el cual debe estar disponible para la implementación de métodos.

También se deben incluir los criterios generales de aceptación del método.

Alguna vez durante el tiempo de vida del método, puede ser necesaria una revalidación del método. La validación puede realizarse de una manera reactiva o proactiva. La validación reactiva puede realizarse en respuesta a cambios en el material (material nuevo), cambios en las condiciones de manufactura y cambios de formulación, entre otros (diluciones, preparación de muestra). La revalidación proactiva puede ser iniciada para tomar ventaja de la nueva tecnología o la automatización intensiva. En tales casos la revalidación puede ser necesaria dependiendo de lo que se desee iniciar.

**ASPECTOS LEGALES Y NORMATIVOS****9.1 ACREDITACION**

La acreditación es un procedimiento en el cual una organización legislativa da formal reconocimiento de que un laboratorio es competente con los análisis específicos. Esto es realizado a través de auditorias externas comparando con estándares reconocidos internacionalmente. La guía ISO 17025 ha sido aceptada como un estándar de acreditación para la prueba de laboratorios. La acreditación sin embargo no es garantía de que el laboratorio produce resultados analíticos aceptables. La acreditación asegura competencia. Prueba que cualquier análisis es de calidad aceptable y debe ser provisto con todos los análisis a través del uso de controles, estándares y material de referencia.

9.2 ESTANDARES DE CALIDAD

En temas anteriores hemos estado desarrollando toda una metodología para la validación de un método o técnica analítica. Todo esto como parte de un sistema de administración de calidad en el laboratorio. Pero que es un sistema de calidad en un laboratorio, aunque el tema esta delimitado a validación, tocaremos el tema de manera no exhaustiva.

Un sistema de administración de calidad en el laboratorio es una estructura formal que prepara y abarca todos los aspectos de calidad en el laboratorio. En muchas formas el sistema es un conjunto de procedimientos dinámicamente relacionados y todos enfocados al cumplimiento de un objetivo común. Todos estos procedimientos deben estar debidamente documentados. El sistema debe cubrir todos los lineamientos y políticas establecidos para el sistema, detallando todos los procedimientos usados por el personal, para asegurar la calidad en los análisis químicos realizados.

El sistema de administración de calidad debe estar escrito en un documento que se llama manual de calidad. La realización de un manual de calidad es un trabajo extremadamente

extenso, y puede tomar desde meses hasta años hacerlo, sin embargo mencionaremos los requerimientos de algunos organismos dedicados a la estandarización de los sistemas de administración de la calidad.

Afortunadamente un gran número de organismos han desarrollado y publicado una serie de procedimientos normativos para laboratorios. Son tres los grupos principales, los cuales han preparado y publicado estándares para los sistemas de calidad. Estos son:

- 1) *The Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD)* Los cuales han desarrollado estándares de buenas prácticas de laboratorio, frecuentemente referidas como “GLP” Posteriormente describiremos todos sus requerimientos y acreditación.
- 2) *International and National Standards Organisation*; han desarrollado estándares en relación a la calidad en el laboratorio en tres niveles, internacional, europeo y británico como sigue:
 - a) *The international Organisation for Standardization (ISO)* ha producido un rango de estándares y guías en relación a los laboratorios. El más relevante de estos es la serie de estándares de calidad ISO-9000, guía 25 ISO “Requerimientos generales para calibración y laboratorios de prueba” y guía 49 ISO “Guías para el desarrollo de un manual de calidad para laboratorios de prueba”.
 - b) *The European Committee for Standardisation (CEN)* han desarrollado un rango de estándares en relación a la calidad como las series EN 29000, las EN 45000, y las BS 7500.
 - c) En Gran Bretaña las *British Standards Institutions (BSI)*, también han producido un rango de estándares de calidad, principalmente la *BS 5750 Quality Standard*, la cual es equivalente a ISO 9000 y a la *EN 29000 Series of European Standards*.
- 3) *The National Laboratory Accreditation Bodies*; desarrollaron más requerimientos de calidad para los laboratorios, usualmente basados en los criterios generales de ISO, EN y algunos otros estándares nacionales. Ellos ofrecen evaluación de laboratorios

de acuerdo con sus requerimientos. En EU la National Measurement Accreditation Service (NAMAS) es el máximo organismo de acreditación de laboratorios.

9.3 REQUERIMIENTOS DE LA GLP

Los requerimientos de la GLP fueron originalmente desarrollados en 1982 por la OECD en su publicación "Good Laboratory Practice in the Testing of Chemicals".

En E.U. el departamento de salud es el responsable de monitorear los laboratorios en competencia con los principios de la GLP. Su folleto Good Laboratory Practice, the United Kingdom Compliance Program. Emitido en 1986 y revisado en 1989.

Los principales requerimientos de la GLP se muestran a continuación:

DIRECCIÓN: Las responsabilidades del personal y la estructura de la dirección del laboratorio deben ser definidas claramente, por medio de gráficos organizacionales, descripción de actividades y análisis de puestos. También se pueden incluir historiales, evaluaciones, cursos y capacidades del personal. Los directores tienen la responsabilidad de vigilar los aspectos técnicos de los analistas para que estos puedan tener una apropiada calificación y puedan ser capaces de realizar su trabajo. Ellos pueden asegurarse de que los protocolos son seguidos y que alguna desviación del protocolo no ocurrirá. También son responsables de estar revisando los registros de datos de los analistas, la preparación del reporte final y el registro en archivos de todo el material.

PROGRAMA DE ASEGURAMIENTO DE CALIDAD

Puede ser un sistema que monitoree todas las actividades y revise que todos los sistemas estén trabajando de acuerdo con los requerimientos de la GLP. Para registrar algún problema, identifique y asegúrese que se tome la acción correctiva correcta. La persona responsable de los procedimientos de aseguramiento de calidad debe ser independiente de el grupo de análisis. El equipo debe estar disponible y se le debe dar mantenimiento y calibración adecuados.

PRUEBA DE FACILIDAD DE TRABAJO CON LOS PROCEDIMIENTOS:

Procedimientos estándares de operación (SOP) deben ser propiamente autorizados, documentados y estar disponibles para el personal del laboratorio. Los SOP deben también ser identificados y controlados para que todos estén concientes de la versión y no usen

información no actual. Los SOP deben ser regularmente revisados para asegurarse de que son apropiados para el programa. Se requiere un sistema para reemplazar versiones de procedimientos que están operando o para posibles actualizaciones.

Reactivos y soluciones deben ser claramente identificados, incluyendo condiciones de almacenamiento y periodo de caducidad.

Se deben registrar todas las especificaciones de pureza, identidad y propiedades de los reactivos.

PLANEACION Y DIRECCIÓN DEL METODO: El título y el propósito del método deberá ser claro, así como quien lo realiza y el tipo de prueba que usara. El tipo de prueba deberá ser documentada al igual que los métodos estadísticos que se usaran en el análisis de los datos. El sistema de almacenamiento de datos deberá ser asignado de acuerdo a la persona responsable.

REPORTE FINAL: El formato del reporte final estará definido por el director y la responsabilidad de el reporte estará a cargo de este.

ALMACENAMIENTO DE DATOS: Es importante que todos los datos generados y algún otro registro de muestras, todos deberán ser retenidos para que estén disponibles para revisión. Este archivo deberá ser controlado por un archivista.

El acceso al archivo deberá ser estrictamente controlado y cualquier modificación o adición deberá ser anotada.

Un laboratorio puede anunciar que esta metodología esta de acuerdo con los principios de la GLP. Sin embargo autoridades regulatorias requerirán que el laboratorio este dentro de la normatividad GLP. Y que la GLP monitoree e inspeccione el laboratorio antes de empezar el desarrollo de las actividades de análisis.

La GLP realiza estas inspecciones cada dos años, en la primera inspección se asegura que todos los principios requeridos por la GLP son implantados. Esto se conoce como *“Implementation Inspection”*

9.4 REQUERIMIENTOS DE LA NAMAS

Los requerimientos generales de la NAMAS parten de los documentos M10 *“The NAMAS accreditation Standard –General criteria for Calibration and Testing Laboratories”*

(incluyendo un suplemento de la M10 publicado en 1993) y la M11 "*NAMAS Regulations – Regulations to be met by Calibration and Testing Laboratories*". Estos están soportados en un rango de documentos mas detallados para un tipo de trabajo en particular. Sus requerimientos generales pueden ser resumidos en los siguientes:

El laboratorio debe tener bien definido un sistema de calidad el cual esta descrito detalladamente en un manual. Este debe partir de desde la acreditación del laboratorio, incluyendo el rango de pruebas en las cuales el laboratorio ha sido acreditado para realizar. Esto también debe incluir a la dirección, responsabilidades técnicas, operación del laboratorio y procedimientos de control de calidad.

Un sistema de auditoria de calidad y un sistema de calidad tienen que ser documentados y operados para que el laboratorio pueda demostrar que los estándares de calidad se mantienen monitoreados y son apropiados.

Un sistema que asegure que el personal esta apropiadamente calificado y capacitado para el desarrollo de su trabajo.

Requerimientos para todos los equipos deben ser listados y asegurarse de que el equipo en uso esta disponible para las tareas, están en buenas condiciones de trabajo y correctamente calibrados.

Las mediciones deberán ser registradas y deberán mostrar como se comparan con los estándares nacionales e internacionales. Donde se desarrollen problemas prácticos en mediciones químicas, por ejemplo comparaciones inter laboratorios y el uso de materiales de referencia (y preferiblemente materiales de referencia certificados) todo esto será requerido.

Métodos y procedimientos incluyendo muestreo, manejo y análisis de muestra y la incertidumbre estimada de los resultados finales. Si es necesario usar algún método no estándar este deberá ser validado y documentado. La integridad de todos los datos analíticos debe ser protegida.

El acondicionamiento del laboratorio deberá estar disponible para los análisis que se realizaran , para demostrar que estos se encuentran en buen estado para realizar análisis delicados. Las muestras deberán ser mantenidas en condiciones adecuadas antes del análisis para asegurar su invariabilidad. Los procedimientos que autoricen desecharlas deberán ser y/o estar documentados.

Se debe contar con un sistema de registro o base de datos, así como reportes, hojas de trabajo bitácoras etc, los cuales deberán permanecer archivados por lo menos 6 años.

El contenido de reportes y certificados deberán entregarse bien cerrados para asegurar que los clientes reciban la información, y que el laboratorio no tenga problemas al respecto.

En el caso de que el laboratorio use los servicios de otro deberá asegurarse de que el trabajo de ese laboratorio esta bien acreditado y validado.

En resumen NAMAS requiere que los procedimientos del laboratorio estén bien documentados para asegurarse de que estos se lleven a cabo correctamente.

9.5 AUDITORIAS DE CALIDAD

Un sistema para auditorias y revisiones de los procedimientos de calidad es un requerimiento de la guía 25 de ISO y esta incluida en los requerimientos de NAMAS y GLP. Este es un aspecto critico en un sistema de calidad. Como el desarrollo de este tema no es objetivo del trabajo solo se mencionara que es importante considerarlo como parte del sistema de calidad al igual que la validación.

9.6 NORMAS MEXICANAS DE CONTROL DE CALIDAD

En México existen varios organismos dedicados a la legislación de la gestión de la calidad, por ejemplo el *Instituto Mexicano de Normalización y Certificación A.C.* En donde se pueden consultar la siguiente lista de normas mexicanas en relación a métodos estadísticos, manuales de calidad y metrología que son los temas de nuestro interés:

- ISO 10013:1995 Directrices para la documentación de los sistemas de gestión de la calidad.

La norma mexicana equivalente es la NMX-CC018:1996 IMNC. Directrices para desarrollar manuales de calidad.

- VIM:1993, International vocabulary of basic and general terms in metrology.

BIPM / IEC / IFCC / ISO /OIML / IUPAC / IUPAP

La norma mexicana equivalente es la NMX-Z-055-1997-IMNC. Metrología y vocabulario de términos fundamentales y generales.

- ISO 10012-1:1992, Requisitos de aseguramiento de la calidad para el equipo de medición.

Parte1: Sistema de confirmación metrología para el equipo de medición.

La norma mexicana equivalente es la NMX-CC-017/1:1995 IMNC, Requisitos de aseguramiento de calidad para equipo de medición parte 1: sistema de confirmación metrológica para equipo de medición.

- ISO 10012-2:1997, Requisitos de aseguramiento de la calidad para el equipo de medición parte 2: Directrices para el control de los procesos de medición.
- ISO/TEC 17025:1999, Requisitos generales para la operación de laboratorios de calibración y ensayo. (anteriormente clasificada como ISO Guide 25, en México tenía la clasificación NMX-EC-025-IMNC-2000)

Ahora la norma mexicana equivalente es la NMX-EC-17025-IMNC-2000, Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración.

Actualmente no existen normas oficiales mexicanas que establezcan requisitos de validación obligatorios, sin embargo para efectos de acreditación o certificación si es necesario cumplir con los requisitos de las normas de calidad (NMX-CC).

9.7 ACREDITACION DE LABORATORIOS DE PRUEBAS

los laboratorios de pruebas son organismos ya sea públicos o privados que se dedican a el análisis de determinados productos, pertenecientes a la industria eléctrica, farmacéutica, química, biotecnológica, etc.

En seguida se muestra un esquema de un proceso de acreditación de un laboratorio de pruebas, establecido por la Entidad Mexicana de Acreditación (EMA) y aprobado por la Comisión Nacional para el Ahorro de Energía (CONAE) y cuyo contenido se puede analizar mas a fondo en la referencia que se encuentra al final de la bibliografía. Además se presentan los principales puntos que incluye un convenio para acreditación de un laboratorio, de acuerdo a un organismo Argentino de acreditación, cuya referencia se encuentra al final de la bibliografía de este trabajo.

Proceso de Acreditación de un Laboratorio de Pruebas

ema:

Recibe la solicitud de acreditación del laboratorio

ema programa visita:

- Evaluación inicial
- Evaluación de seguimiento
- Evaluación de renovación

Evaluación:

Grupo evaluador:
 - Evaluador líder
 - Evaluador(es)
 - Evaluador en entrenamiento
 - Representante de Conae

Evaluación documental

- Aseguramiento de Calidad
- Procedimientos

Evaluación técnica

- Evaluación del personal
- Aplicación del método de prueba
- Calibración de instrumentos
- Sistema de adquisición de datos confiable
- Informe de resultados

Laboratorio:

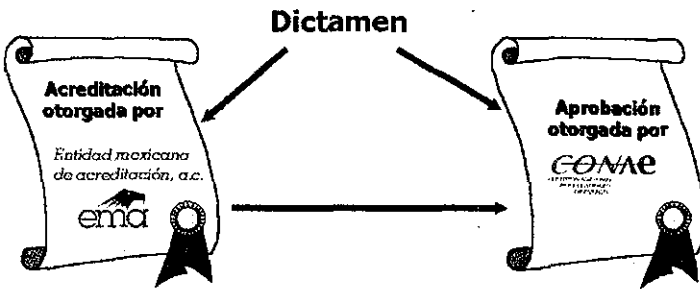
Resultados de la evaluación

El laboratorio cumple satisfactoriamente la evaluación

Hay observaciones del grupo evaluador, el laboratorio presenta acciones correctivas (ante ema y Conae)

El laboratorio no está preparado para relizar las pruebas, solicita nueva visita

Si cumple satisfactoriamente la evaluación:



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

CONVENIO PARA LA ACREDITACIÓN
DE LABORATORIOS DE CALIBRACIÓN

En la ciudad de Buenos Aires a los días del mes de de dos mil, entre el Organismo Argentino de Acreditación, en adelante "OAA", con domicilio constituido a todos los efectos legales en la Avenida Julio A. Roca 651 - 5° Piso, Sectores 8 y 9 de la ciudad de Buenos Aires, representado en este acto por su Presidente, Lic. Alberto José Valle, y, en adelante "el Laboratorio", con domicilio legal en, representado en este acto por su, convienen en celebrar el presente acuerdo.

CONSIDERANDO:

Que el Laboratorio ha demostrado evidencias objetivas de su competencia técnica para cumplimentar los requisitos establecidos por el OAA, enmarcados dentro de la norma IRAM 301vigente, equivalente a la ISO / IEC 17025. Por lo expuesto, ambas partes acuerdan celebrar el presente Convenio de conformidad con las siguientes cláusulas y condiciones:

1. DEFINICIONES. A efectos de facilitar y delimitar el alcance de los términos utilizados en el presente, los mismos serán los correspondientes a las definiciones y vocabulario empleado en las normas IRAM-ISO 8402, ISO IEC 17025 y serie IRAM-300.
2. OBJETO. De conformidad con la evaluación, verificación y aprobación realizada por el OAA de los requisitos de funcionamiento declarados por el Laboratorio en la solicitud de acreditación, se concede al mismo la Acreditación para efectuar las calibraciones indicados en el Anexo I del presente Convenio, de acuerdo con las condiciones previstas en el Reglamento del OAA y las regulaciones particulares que, indicadas en el Anexo II, forman parte integrante del presente Convenio.
3. ALCANCE DE LA ACREDITACIÓN. La acreditación del Laboratorio por el OAA consiste en la aprobación formal de su competencia de acuerdo a los criterios establecidos en el presente Convenio y en las normas aplicables, autorizándose en consecuencia al mismo a citar la acreditación concedida en los informes referidos a las calibraciones para los que está acreditado y en la documentación propia que haga referencia sólo a esas calibraciones. Toda calibración efectuado que no se encuentre incluido en el Anexo N° I

deberá evitar cualquier mención al OAA, bajo apercibimiento de inmediata rescisión del Convenio. El laboratorio deberá incluir en todos los informes que emita el logotipo del OAA o la referencia a la condición de acreditado de acuerdo al modelo indicado en el Anexo III del presente.

9. INFORMES DE CALIBRACIONES. El Laboratorio podrá emitir informes de las calibraciones que efectúa en el marco de la acreditación acordada y del presente Convenio. Los mismos deberán indicar las especificaciones establecidas en las normas aplicables y serán emitidos en dos ejemplares iguales, identificados bajo el mismo número y llevarán la firma del Director Técnico o Subdirector Técnico. Un ejemplar será entregado al cliente y el otro se guardará en el Laboratorio. Los informes serán numerados por el Laboratorio en riguroso orden cronológico. Toda inobservancia de esta regla de la numeración y orden cronológico podrá acarrear la cancelación de la acreditación. El laboratorio registrará en un libro especial los informes que vaya emitiendo, que será llevado por el Director Técnico o Subdirector Técnico.

El laboratorio garantizará la imparcialidad en la emisión de sus informes y resultados.

10. OBLIGACIÓN. El responsable del laboratorio tendrá la obligación de asegurar que:

- a) todos las calibraciones acreditadas serán efectuadas según el procedimiento establecido en el propio Manual de la Calidad, y de Procedimientos integrantes de la documentación en base a la cual se otorgó la acreditación.
- b) Producirá Informes de Calibración para los que este acreditado, conforme al punto 5.10.2 de la norma IRAM 301 vigente.
- c) Cuando se verifique el deterioro de muestras y / o instrumentos involucrados en la calibración, y no exista la competencia y la capacidad del laboratorio para solucionarlo, deberá suspender la actividad del Laboratorio Acreditado, informando al sector interesado de la deficiencia surgida, dando inmediata comunicación al OAA. La limitación de la actividad puede permanecer hasta que las acciones correctivas sean efectuadas y aceptadas por el OAA.
- d) Entregar al OAA toda revisión del Manual de la Calidad que efectúe durante la vigencia del presente Convenio.
- e) Permitir que los Evaluadores del OAA efectúen las Visitas de Evaluación que el OAA estime necesarias a fin de verificar el mantenimiento de la conformidad del Laboratorio con

los requerimientos exigidos para su acreditación, disponiendo al efecto toda la cooperación necesaria.

El Laboratorio está obligado a informar inmediatamente al OAA de:

- a) interrupción de la actividad relacionada con el presente Convenio;
- b) renuncia o retiro del Responsable del Laboratorio;
- c) renuncia del sustituto o reemplazante del Responsable del Laboratorio;
- d) renuncia o retiro del Responsable del Sistema de la Calidad;
- e) cambio en la organización, en su estructura o sus procedimientos y otros que afecten el normal desenvolvimiento de las actividades acreditadas.

El Laboratorio, en el caso b), c) y d), se compromete a presentar al OAA el nombre del nuevo responsable designado y su correspondiente "Curriculum Vitae". El Responsable del Laboratorio y su reemplazante podrán firmar informes de calibración solamente luego de que le fuera notificada la respectiva aceptación por parte del OAA.

14. CALIBRACIÓN. El Laboratorio deberá cumplimentar la obligación de calibrar sus propios aparatos o equipos de medida con la periodicidad definida en su Manual de la Calidad y deberá mantener registros adecuados de todas las calibraciones efectuadas en el tiempo de uso de los instrumentos. Estos registros deberán estar documentados, actualizados y refrendados por el Responsable del Laboratorio.

15. ENSAYOS INTERLABORATORIOS. El Laboratorio se compromete a efectuar comparaciones interlaboratorios.

16. TRASLADO DEL LABORATORIO. Si por cualquier motivo el Laboratorio, su equipamiento o su personal se trasladaran, éste deberá cesar las operaciones temporariamente, debiendo el Laboratorio presentar nuevamente la solicitud de acreditación por traslado del laboratorio. El Laboratorio podrá reanudar las calibraciones previa evaluación realizada por el OAA a las nuevas instalaciones.

31. NORMAS APLICABLES. El Laboratorio declara conocer y aceptar los principios fundamentales y las normas de funcionamiento del OAA que le fueran comunicadas oportunamente, en especial las que establecen los siguientes documentos: a) ISO / IEC 17025 - equivalente Norma IRAM 301 vigente - b) los Procedimientos y Reglamentos del OAA. El OAA se reserva el derecho de modificar los procedimientos, en función de los cambios que sufran las normas, en cualquier momento, obligándose a comunicar las

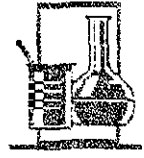
novedades al Laboratorio. Si éste no aceptara las modificaciones, podrá rescindir anticipadamente el presente Convenio.

38. NOTIFICACIONES. Cualquier notificación requerida o que deba darse de acuerdo al presente, por cualquiera de las partes a la otra deberá ser por escrito y enviada por carta, con constancia de recepción de su contenido, telegrama o carta documento. Dicha notificación, si es efectuada por el OAA debe dirigirse a, o a otra dirección que en el futuro indique el Laboratorio en la misma forma; si dicha notificación fuere dada por el Laboratorio debe dirigirse al Organismo Argentino de Acreditación, Av. Julio A. Roca 651, 5° Piso, sectores 8 y 9 - Capital Federal (1322), o a otra dirección que en el futuro éste indique en la misma forma. El envío de dicha notificación en la forma preindicada será considerado notificación suficiente. Se considerará como fecha de la notificación la fecha de constancia de recepción.

40. ANEXOS. El presente Convenio consta de los siguientes anexos que, en su totalidad, forman parte integrante del mismo:

- 1) Alcance para el que se concede la acreditación.
- 2) Reglamento General para la Acreditación de Entidades y Procedimiento para Evaluación y Acreditación de Laboratorios de Calibración.
- 3) Logotipo del OAA.
- 4) Plan de seguimiento de la acreditación otorgada.

En prueba de conformidad se firman 2 ejemplares de un mismo tenor y a un solo efecto en el lugar y fecha indicado en el encabezamiento del presente.



CONCLUSIONES

La validación es un proceso que se encuentra en constante evolución que inicia desde el acondicionamiento de un laboratorio y continua durante el desarrollo y transferencia de los métodos analíticos. El desarrollo, optimización y validación aplicados en un orden lógico pueden ser un buen recurso para un laboratorio si son usados de una manera eficiente y productiva.

En lo que se refiere a criterios de aceptación, algunos organismos no requieren un tratamiento estadístico fuerte en la validación, esto se debe a que no existen normas oficiales obligatorias para la validación. La realización de una validación muy completa será decisión de las personas competentes y claro considerando siempre los requerimientos del cliente.

Un proceso de validación bien definido y documentado provee a organismos legislativos evidencia de que los métodos y sistemas disponibles son confiables y seguros.

La validación de un método analítico es el proceso por el cual queda establecido, por estudios de laboratorio que la capacidad del método satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas. La capacidad se expresa en este caso, en términos de parámetros analíticos.

El proceso de validación de un método en particular está basado en principios científicos adecuados y ha sido optimizado para propósitos prácticos de medición.

En la aplicación de los criterios de evaluación de un método analítico prevalecerá ante todo la experiencia y el criterio de la persona que lleve a cabo la validación.

La implementación de una metodología de validación dentro del sistema de calidad de cualquier laboratorio es de gran importancia debido a las exigencias de las organizaciones que están certificadas y que requieren del servicio de laboratorios confiables.



BIBLIOGRAFÍA

- (1) AOAC OFICIAL METHODS OF ANALYSIS (2000)
Laboratory Quality Assurance a) Appendix E. b) Appendix B c) Appendix A d)
- (2) Chimal Portilla Enrique. (1995) Estadística (primer curso) Mc Graw Hill México.
- (3) Christine Ye, June Liu, Feiyan Ren, Ngozi Okafo. (2000), Design of Experiments and data analysis by JMP (SAS institute) in analytical method validation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 23, 581-589.
- (4) Devore Jay L. (1998) Probabilidad y estadística para ingeniería y ciencias. Ed. International Thompson Editores., 4ta edic. México.
- (5) Geneva, (1994) Precision of test methods. ISO 5725 (previa edición en 1986)
- (6) Hilko Van Der Voet, J.A. (Hans) Van Rhijn, Henk J. Van de Wiel. (1999), Inter-Laboratory, Time and Fitness-for-purpose aspects of effective validation. *Analytica Chimica Acta*, 391, 159-171.
- (7) HORWITZ, William. Official Methods of Analysis of AOAC International Edic. 17 V. I Agricultural Chemicals; Contaminants; Drugs.
- (8) Miller J.C. Miller J.M, (1993) Estadística para química analítica Ed. Addison-Wesley Iberoamericana 2da edic. México.
- (9) Piet van Zoonen, Ronald Hoogerbrugge, Steven M. Gort, Henk J. van de Wiel, Henk A. van't Klooster. (1999), Some practical examples of method validation in the analytical laboratory. *Trends in Analytical Chemistry*, vol. 19, nos.9-10, 584-592.
- (10) PRADEAU, Dominique. (1998) Análisis Químicos Farmacéuticos de Medicamentos, Editorial Noriega UTEHA, 1ra edic. México.
- (11) PRICHARD, F. Elizabeth. (1995) Quality in the Analytical Chemistry Laboratory Ed. John Wiley & Sons Great Britain.
- (12) RIVEROS G. Héctor, Lucia Rosas. (1997) El método científico aplicado a las ciencias experimentales. Ed. Trillas, 2da edic. México.

-
- (13) RVA-SC08, (1996) Anvullende criteria voor methode-validatie, Raad voor Accreditatie (Dutch Board for Accreditation)
- (14) SWARTZ, Michael, Ira S. Krull. (1997) Analytical Method Development and Validation, Ed. Marcel Dekker United States of America.
- (15) Taylor Keenan John. (1989) Quality Assurance of Chemical Measurements. Ed. Lewis Publishers. Inc. Michigan.
- (16) Wood Roger. (1999), How to validate analytical methods. Trends in Analytical Chemistry. Vol. 18 nos. 9-10, 624-632
- (17) Thomas Michael J.K, (1997) Ultraviolet and Visible Spectroscopy, Ed. John Wiley & Sons, 2da. edic. Great Britain.

Dirección de Normalización, Certificación y Verificación.

Teléfono: 5322-1000

Ext: 1114 y 1115

E-mail: nor@conae.gob.mx

Certificación / Ext. 1118 / E-mail: cert@conae.gob.mx

Laboratorios de Prueba / Ext. 1126 / E-mail: lab@conae.gob.mx

ANEXO
Tabla 1

Values for Use in the Grubbs Test for Outliers

Number of Data Points	Risk of False Rejection				
	0.1%	0.5%	1%	5%	10%
3	1.155	1.155	1.155	1.153	1.148
4	1.496	1.496	1.492	1.463	1.425
5	1.780	1.764	1.749	1.672	1.602
6	2.011	1.973	1.944	1.822	1.729
7	2.201	2.139	2.097	1.938	1.828
8	2.358	2.274	2.221	2.032	1.909
9	2.492	2.387	2.323	2.110	1.977
10	2.606	2.482	2.410	2.176	2.036
15	2.997	2.806	2.705	2.409	2.247
20	3.230	3.001	2.884	2.557	2.385
25	3.389	3.135	3.009	2.663	2.486
50	3.789	3.483	3.336	2.956	2.768
100	4.084	3.754	3.600	3.207	3.017

Tabulated values obtained in part from ASTM E-178 [15] which should be consulted for more extensive tables. See page 37 for discussion of treatment of outliers. Original reference: F. E. Grubbs and G. Beck, "Extension of Sample Sizes and Percentage Points for Significance Tests of Outlying Observations," *Technometrics*, TCMTA, 14 (No. 4): 847-54 (November 1972).

Tabla 2

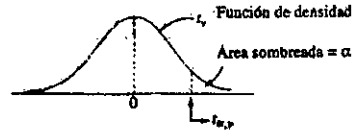
Values for Use in the Dixon Test for Outliers

Statistic	Number of Observations, n	Risk of False Rejection			
		0.5%	1%	5%	10%
r_{10}	3	.994	.988	.941	.886
	4	.926	.889	.765	.679
	5	.821	.780	.642	.557
	6	.740	.698	.560	.482
	7	.680	.637	.507	.434
r_{11}	8	.725	.683	.554	.479
	9	.677	.635	.512	.441
	10	.639	.597	.477	.409
r_{21}	11	.713	.679	.576	.517
	12	.675	.642	.546	.490
	13	.649	.615	.521	.467
r_{22}	14	.674	.641	.546	.492
	15	.647	.616	.525	.472
	16	.624	.595	.507	.454
	17	.605	.577	.490	.438
	18	.589	.561	.475	.424
	19	.575	.547	.462	.412
	20	.562	.535	.450	.401

Tabulated values obtained from Natrella [100]. See page 36 for discussion. Original reference: W. J. Dixon, "Processing Data Outliers," *Biometrics*, BIOMA, 9 (No.1): 74-89 (March 1953).

ANEXO
Tabla 3

Valores críticos $t_{\alpha, v}$ para la distribución t



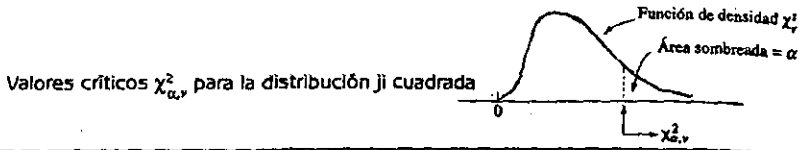
v	.10	.05	.025	.01	.005	.001	.0005
1	3.078	6.314	12.706	31.821	63.657	318.31	636.62
2	1.886	2.920	4.303	6.965	9.925	22.326	31.598
3	1.638	2.353	3.182	4.541	5.841	10.213	12.924
4	1.533	2.132	2.776	3.747	4.604	7.173	8.610
5	1.476	2.015	2.571	3.365	4.032	5.893	6.869
6	1.440	1.943	2.447	3.143	3.707	5.208	5.959
7	1.415	1.895	2.365	2.998	3.499	4.785	5.408
8	1.397	1.860	2.306	2.896	3.355	4.501	5.041
9	1.383	1.833	2.262	2.821	3.250	4.297	4.781
10	1.372	1.812	2.228	2.764	3.169	4.144	4.587
11	1.363	1.796	2.201	2.718	3.106	4.025	4.437
12	1.356	1.782	2.179	2.681	3.055	3.930	4.318
13	1.350	1.771	2.160	2.650	3.012	3.852	4.221
14	1.345	1.761	2.145	2.624	2.977	3.787	4.140
15	1.341	1.753	2.131	2.602	2.947	3.733	4.073
16	1.337	1.746	2.120	2.583	2.921	3.686	4.015
17	1.333	1.740	2.110	2.567	2.898	3.646	3.965
18	1.330	1.734	2.101	2.552	2.878	3.610	3.922
19	1.328	1.729	2.093	2.539	2.861	3.579	3.883
20	1.325	1.725	2.086	2.528	2.845	3.552	3.850
21	1.323	1.721	2.080	2.518	2.831	3.527	3.819
22	1.321	1.717	2.074	2.508	2.819	3.505	3.792
23	1.319	1.714	2.069	2.500	2.807	3.485	3.767
24	1.318	1.711	2.064	2.492	2.797	3.467	3.745
25	1.316	1.708	2.060	2.485	2.787	3.450	3.725
26	1.315	1.706	2.056	2.479	2.779	3.435	3.707
27	1.314	1.703	2.052	2.473	2.771	3.421	3.690
28	1.313	1.701	2.048	2.467	2.763	3.408	3.674
29	1.311	1.699	2.045	2.462	2.756	3.396	3.659
30	1.310	1.697	2.042	2.457	2.750	3.385	3.646
40	1.303	1.684	2.021	2.423	2.704	3.307	3.551
60	1.296	1.671	2.000	2.390	2.660	3.232	3.460
120	1.289	1.658	1.980	2.358	2.617	3.160	3.373
∞	1.282	1.645	1.960	2.326	2.576	3.090	3.291

FUENTE: Esta tabla se reproduce con el amable permiso de los miembros del directorio de Biometrika, de E. S. Pearson y H. O. Hartley (eds.), *The Biometrika Tables for Statisticians*, vol. 1, 3a ed., Biometrika, 1966.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ANEXO

Tabla 4



v	alpha									
	.995	.99	.975	.95	.90	.10	.05	.025	.01	.005
1	0.000	0.000	0.001	0.004	0.016	2.706	3.843	5.025	6.637	7.882
2	0.010	0.020	0.051	0.103	0.211	4.605	5.992	7.378	9.210	10.597
3	0.072	0.115	0.216	0.352	0.584	6.251	7.815	9.348	11.344	12.837
4	0.207	0.297	0.484	0.711	1.064	7.779	9.488	11.143	13.277	14.860
5	0.412	0.554	0.831	1.145	1.610	9.236	11.070	12.832	15.085	16.748
6	0.676	0.872	1.237	1.635	2.204	10.645	12.592	14.440	16.812	18.548
7	0.989	1.239	1.690	2.167	2.833	12.017	14.067	16.012	18.474	20.276
8	1.344	1.646	2.180	2.733	3.490	13.362	15.507	17.534	20.090	21.954
9	1.735	2.088	2.700	3.325	4.168	14.684	16.919	19.022	21.665	23.587
10	2.156	2.558	3.247	3.940	4.865	15.987	18.307	20.483	23.209	25.188
11	2.603	3.053	3.816	4.575	5.578	17.275	19.675	21.920	24.724	26.755
12	3.074	3.571	4.404	5.226	6.304	18.549	21.026	23.337	26.217	28.300
13	3.565	4.107	5.009	5.892	7.041	19.812	22.362	24.735	27.687	29.817
14	4.075	4.660	5.629	6.571	7.790	21.064	23.685	26.119	29.141	31.319
15	4.600	5.229	6.262	7.261	8.547	22.307	24.996	27.488	30.577	32.799
16	5.142	5.812	6.908	7.962	9.312	23.542	26.296	28.845	32.000	34.267
17	5.697	6.407	7.564	8.682	10.085	24.769	27.587	30.190	33.408	35.716
18	6.265	7.015	8.231	9.390	10.865	25.989	28.869	31.526	34.805	37.156
19	6.843	7.632	8.906	10.117	11.651	27.203	30.143	32.852	36.190	38.580
20	7.434	8.260	9.591	10.851	12.443	28.412	31.410	34.170	37.566	39.997
21	8.033	8.897	10.283	11.591	13.240	29.615	32.670	35.478	38.930	41.399
22	8.643	9.542	10.982	12.338	14.042	30.813	33.924	36.781	40.289	42.796
23	9.260	10.195	11.688	13.090	14.848	32.007	35.172	38.075	41.637	44.179
24	9.886	10.856	12.401	13.848	15.659	33.196	36.415	39.364	42.980	45.558
25	10.519	11.523	13.120	14.611	16.473	34.381	37.652	40.646	44.313	46.925
26	11.160	12.198	13.844	15.379	17.292	35.563	38.885	41.923	45.642	48.290
27	11.807	12.878	14.573	16.151	18.114	36.741	40.113	43.194	46.962	49.642
28	12.461	13.565	15.308	16.928	18.939	37.916	41.337	44.461	48.278	50.993
29	13.120	14.256	16.147	17.708	19.768	39.087	42.557	45.772	49.586	52.333
30	13.787	14.954	16.991	18.493	20.599	40.256	43.773	46.979	50.892	53.672
31	14.457	15.655	17.538	19.280	21.433	41.422	44.985	48.231	52.190	55.000
32	15.134	16.362	18.291	20.072	22.271	42.585	46.194	49.480	53.486	56.328
33	15.814	17.073	19.046	20.866	23.110	43.745	47.400	50.724	54.774	57.646
34	16.501	17.789	19.806	21.664	23.952	44.903	48.602	51.966	56.061	58.964
35	17.191	18.508	20.569	22.465	24.796	46.059	49.802	53.203	57.340	60.272
36	17.887	19.233	21.336	23.269	25.643	47.212	50.998	54.437	58.619	61.581
37	18.584	19.960	22.105	24.075	26.492	48.363	52.192	55.667	59.891	62.880
38	19.289	20.691	22.878	24.884	27.343	49.513	53.384	56.896	61.162	64.181
39	19.994	21.425	23.654	25.695	28.196	50.660	54.572	58.119	62.426	65.473
40	20.706	22.164	24.433	26.509	29.050	51.805	55.758	59.342	63.691	66.766

Para $v > 40$, $x_{\alpha, v}^2 = v \left(1 - \frac{2}{9v} + z_{\alpha} \sqrt{\frac{2}{9v}} \right)^3$

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ANEXO
Tabla 5

Valores críticos F_{α, v_1, v_2} para la distribución F

v_1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	15	20	24	30	40	60	120	∞
1	161.4	199.5	215.7	224.6	230.2	234.0	236.8	238.9	240.5	241.9	243.9	245.9	248.0	249.1	250.1	251.1	252.2	253.3	254.3
2	18.51	19.00	19.16	19.25	19.30	19.33	19.35	19.37	19.38	19.40	19.41	19.43	19.45	19.45	19.46	19.47	19.48	19.49	19.50
3	10.13	9.55	9.28	9.12	9.01	8.94	8.89	8.85	8.81	8.79	8.74	8.70	8.66	8.64	8.62	8.59	8.57	8.55	8.53
4	7.71	6.94	6.59	6.39	6.26	6.16	6.09	6.04	6.00	5.96	5.91	5.86	5.80	5.77	5.75	5.72	5.69	5.66	5.63
5	6.61	5.79	5.41	5.19	5.05	4.95	4.88	4.82	4.77	4.74	4.68	4.62	4.56	4.53	4.50	4.46	4.43	4.40	4.36
6	5.99	5.14	4.76	4.53	4.39	4.28	4.21	4.15	4.10	4.06	4.00	3.94	3.87	3.84	3.81	3.77	3.74	3.70	3.67
7	5.59	4.74	4.35	4.12	3.97	3.87	3.79	3.73	3.68	3.64	3.57	3.51	3.44	3.41	3.38	3.34	3.30	3.27	3.23
8	5.32	4.46	4.07	3.84	3.69	3.58	3.50	3.44	3.39	3.35	3.28	3.22	3.15	3.12	3.08	3.04	3.01	2.97	2.93
9	5.12	4.26	3.86	3.63	3.48	3.37	3.29	3.23	3.18	3.14	3.07	3.01	2.94	2.90	2.86	2.83	2.79	2.75	2.71
10	4.96	4.10	3.71	3.48	3.33	3.22	3.14	3.07	3.02	2.98	2.91	2.85	2.77	2.74	2.70	2.66	2.62	2.58	2.54
11	4.84	3.98	3.59	3.36	3.20	3.09	3.01	2.95	2.90	2.85	2.79	2.72	2.65	2.61	2.57	2.53	2.49	2.45	2.40
12	4.75	3.89	3.49	3.26	3.11	3.00	2.91	2.85	2.80	2.75	2.69	2.62	2.54	2.51	2.47	2.43	2.38	2.34	2.30
13	4.67	3.81	3.41	3.18	3.03	2.92	2.83	2.77	2.71	2.66	2.60	2.53	2.46	2.42	2.38	2.34	2.30	2.25	2.21
14	4.60	3.74	3.34	3.11	2.96	2.85	2.76	2.70	2.65	2.60	2.53	2.46	2.39	2.35	2.31	2.27	2.22	2.18	2.13
15	4.54	3.68	3.29	3.06	2.90	2.79	2.71	2.64	2.59	2.54	2.48	2.40	2.33	2.29	2.25	2.20	2.16	2.11	2.07
16	4.49	3.63	3.24	3.01	2.85	2.74	2.66	2.59	2.54	2.49	2.42	2.35	2.28	2.24	2.19	2.15	2.11	2.06	2.01
17	4.45	3.59	3.20	2.96	2.81	2.70	2.61	2.55	2.49	2.45	2.38	2.31	2.23	2.19	2.15	2.10	2.06	2.01	1.96
18	4.41	3.55	3.16	2.93	2.77	2.66	2.58	2.51	2.46	2.41	2.34	2.27	2.19	2.15	2.11	2.06	2.02	1.97	1.92
19	4.38	3.52	3.13	2.90	2.74	2.63	2.54	2.48	2.42	2.38	2.31	2.23	2.16	2.11	2.07	2.03	1.98	1.93	1.88
20	4.35	3.49	3.10	2.87	2.71	2.60	2.51	2.45	2.39	2.35	2.28	2.20	2.12	2.08	2.04	1.99	1.95	1.90	1.84
21	4.32	3.47	3.07	2.84	2.68	2.57	2.49	2.42	2.37	2.32	2.25	2.18	2.10	2.05	2.01	1.96	1.92	1.87	1.81
22	4.30	3.44	3.05	2.82	2.66	2.55	2.46	2.40	2.34	2.30	2.23	2.15	2.07	2.03	1.98	1.94	1.89	1.84	1.78
23	4.28	3.42	3.03	2.80	2.64	2.53	2.44	2.37	2.32	2.27	2.20	2.13	2.05	2.01	1.96	1.91	1.86	1.81	1.76
24	4.26	3.40	3.01	2.78	2.62	2.51	2.42	2.36	2.30	2.25	2.18	2.11	2.03	1.98	1.94	1.89	1.84	1.79	1.73
25	4.24	3.39	2.99	2.76	2.60	2.49	2.40	2.34	2.28	2.24	2.16	2.09	2.01	1.96	1.92	1.87	1.82	1.77	1.71
26	4.23	3.37	2.98	2.74	2.59	2.47	2.39	2.32	2.27	2.22	2.15	2.07	1.99	1.95	1.90	1.85	1.80	1.75	1.69
27	4.21	3.35	2.96	2.73	2.57	2.46	2.37	2.31	2.25	2.20	2.13	2.06	1.97	1.93	1.88	1.84	1.79	1.73	1.67
28	4.20	3.34	2.95	2.71	2.56	2.45	2.36	2.29	2.24	2.19	2.12	2.04	1.96	1.91	1.87	1.82	1.77	1.71	1.65
29	4.18	3.33	2.93	2.70	2.55	2.43	2.35	2.28	2.22	2.18	2.10	2.03	1.94	1.90	1.85	1.81	1.75	1.70	1.64
30	4.17	3.32	2.92	2.69	2.53	2.42	2.33	2.27	2.21	2.16	2.09	2.01	1.93	1.89	1.84	1.79	1.74	1.68	1.62
40	4.08	3.23	2.84	2.61	2.45	2.34	2.25	2.18	2.12	2.08	2.00	1.92	1.84	1.79	1.74	1.69	1.64	1.58	1.51
60	4.00	3.15	2.76	2.53	2.37	2.25	2.17	2.10	2.04	1.99	1.92	1.84	1.75	1.70	1.65	1.59	1.53	1.47	1.39
120	3.92	3.07	2.68	2.45	2.29	2.17	2.09	2.02	1.96	1.91	1.83	1.75	1.66	1.61	1.55	1.50	1.43	1.35	1.25
∞	3.84	3.00	2.60	2.37	2.21	2.10	2.01	1.94	1.88	1.83	1.75	1.67	1.57	1.52	1.46	1.39	1.32	1.22	1.00

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ANEXO
Tabla 6

Valores críticos $Q_{\alpha, m, v}$ para la distribución del rango estudentizado

		m									
v	α	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
5	.05	3.64	4.60	5.22	5.67	6.03	6.33	6.58	6.80	6.99	7.17
	.01	5.70	6.98	7.80	8.42	8.91	9.32	9.67	9.97	10.24	10.48
6	.05	3.46	4.34	4.90	5.30	5.63	5.90	6.12	6.32	6.49	6.65
	.01	5.24	6.33	7.03	7.56	7.97	8.32	8.61	8.87	9.10	9.30
7	.05	3.34	4.16	4.68	5.06	5.36	5.61	5.82	6.00	6.16	6.30
	.01	4.95	5.92	6.54	7.01	7.37	7.68	7.94	8.17	8.37	8.55
8	.05	3.26	4.04	4.53	4.89	5.17	5.40	5.60	5.77	5.92	6.05
	.01	4.75	5.64	6.20	6.62	6.96	7.24	7.47	7.66	7.86	8.03
9	.05	3.20	3.95	4.41	4.76	5.02	5.24	5.43	5.59	5.74	5.87
	.01	4.60	5.43	5.96	6.35	6.66	6.91	7.13	7.33	7.49	7.65
10	.05	3.15	3.88	4.33	4.65	4.91	5.12	5.30	5.46	5.60	5.72
	.01	4.48	5.27	5.77	6.14	6.43	6.67	6.87	7.05	7.21	7.36
11	.05	3.11	3.82	4.26	4.57	4.82	5.03	5.20	5.35	5.49	5.61
	.01	4.39	5.15	5.62	5.97	6.25	6.48	6.67	6.84	6.99	7.13
12	.05	3.08	3.77	4.20	4.51	4.75	4.95	5.12	5.27	5.39	5.51
	.01	4.32	5.05	5.50	5.84	6.10	6.32	6.51	6.67	6.81	6.94
13	.05	3.06	3.73	4.15	4.45	4.69	4.88	5.05	5.19	5.32	5.43
	.01	4.26	4.96	5.40	5.73	5.98	6.19	6.37	6.53	6.67	6.79
14	.05	3.03	3.70	4.11	4.41	4.64	4.83	4.99	5.13	5.25	5.36
	.01	4.21	4.89	5.32	5.63	5.88	6.08	6.26	6.41	6.54	6.66
15	.05	3.01	3.67	4.08	4.37	4.59	4.78	4.94	5.08	5.20	5.31
	.01	4.17	4.84	5.25	5.56	5.80	5.99	6.16	6.31	6.44	6.55
16	.05	3.00	3.65	4.05	4.33	4.56	4.74	4.90	5.03	5.15	5.26
	.01	4.13	4.79	5.19	5.49	5.72	5.92	6.08	6.22	6.35	6.46
17	.05	2.98	3.63	4.02	4.30	4.52	4.70	4.86	4.99	5.11	5.21
	.01	4.10	4.74	5.14	5.43	5.66	5.85	6.01	6.15	6.27	6.38
18	.05	2.97	3.61	4.00	4.28	4.49	4.67	4.82	4.96	5.07	5.17
	.01	4.07	4.70	5.09	5.38	5.60	5.79	5.94	6.08	6.20	6.31
19	.05	2.96	3.59	3.98	4.25	4.47	4.65	4.79	4.92	5.04	5.14
	.01	4.05	4.67	5.05	5.33	5.55	5.73	5.89	6.02	6.14	6.25
20	.05	2.95	3.58	3.96	4.23	4.45	4.62	4.77	4.90	5.01	5.11
	.01	4.02	4.64	5.02	5.29	5.51	5.69	5.84	5.97	6.09	6.19
24	.05	2.92	3.53	3.90	4.17	4.37	4.54	4.68	4.81	4.92	5.01
	.01	3.96	4.55	4.91	5.17	5.37	5.54	5.69	5.81	5.92	6.02
30	.05	2.89	3.49	3.85	4.10	4.30	4.46	4.60	4.72	4.82	4.92
	.01	3.89	4.45	4.80	5.05	5.24	5.40	5.54	5.65	5.76	5.85
40	.05	2.86	3.44	3.79	4.04	4.23	4.39	4.52	4.63	4.73	4.82
	.01	3.82	4.37	4.70	4.93	5.11	5.26	5.39	5.50	5.60	5.69
60	.05	2.83	3.40	3.74	3.98	4.16	4.31	4.44	4.55	4.65	4.73
	.01	3.76	4.28	4.59	4.82	4.99	5.13	5.25	5.36	5.45	5.53
120	.05	2.80	3.36	3.68	3.92	4.10	4.24	4.36	4.47	4.56	4.64
	.01	3.70	4.20	4.50	4.71	4.87	5.01	5.12	5.21	5.30	5.37
∞	.05	2.77	3.31	3.63	3.86	4.03	4.17	4.29	4.39	4.47	4.55
	.01	3.64	4.12	4.40	4.60	4.76	4.88	4.99	5.08	5.16	5.23