



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

---

FACULTAD DE QUIMICA

**VALIDACIÓN DE METODOLOGÍAS INSTRUMENTALES**

TRABAJO ESCRITO VÍA CURSOS DE EDUCACIÓN CONTINUA

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**QUÍMICA**

PRESENTA

**ANGÉLICA DEL CARMEN HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ**



MÉXICO, D.F.

EXAMENES PROFESIONALES 2005  
FACULTAD DE QUIMICA

m. 348557



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.

Jurado asignado:

Presidente	Profa. Silvia Mendoza Arellano
Vocal	Prof. Adolfo García Osuna
Secretario	Profa. María Estela de la Torre Gómez Tagle
1er. Suplente	Prof. Filiberto Rivera Torres
2do. Suplente	Prof. Zoila Nieto Villalobos

Sitio en donde se desarrolló el tema	Departamento de Química Analítica Edificio "A" Laboratorio 3 B Facultad de Química Ciudad Universitaria
--------------------------------------	--

Asesor del tema

  
Q. Adolfo García Osuna

Sustentante

  
Angélica del Carmen Hernández Hernández

*Si piensas que puedes tú puedes. Y si piensas que no puedes, tienes razón.*

## *Agradezco*

*A Dios por el amor que me demuestra a cada instante*

*A ti, David, hijo mío por darle motivo a mi vida*

*A mis padres<sup>+</sup> por su ejemplo y alegría de vivir*

*A mis hermanos y sobrinos por el cariño y apoyo que cada uno de ellos siempre me han brindado*

*A mis maestros, amigos y compañeros de quienes he aprendido tanto*

*Al maestro Adolfo García Osuna por su apoyo, estímulo y confianza al realizar este trabajo*

# VALIDACIÓN DE METODOLOGÍAS INSTRUMENTALES

## ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN	1
2	ANTECEDENTES	3
2.1	Técnicas instrumentales	3
2.2	Validación de métodos	3
3	DISCUSIÓN	4
3.1	Parámetros de desempeño	4
3.1.1	Condiciones óptimas de trabajo	5
3.1.2	Confirmación de identidad y selectividad/especificidad	6
3.1.3	Intervalo de trabajo e intervalo de linealidad	8
3.1.4	Precisión (repetibilidad y reproducibilidad)	12
3.1.5	Sensibilidad	14
3.1.6	Límite de detección	16
3.1.7	Límite de cuantificación	17
3.1.8	Recobro	19
3.1.9	Robustez	21
3.1.10	Exactitud, veracidad, sesgo	22
3.2	Evaluación y comparaciones de resultados	25
3.2.1	Comparación de un conjunto de resultados con un valor de referencia.	25
3.2.2	Comparación de varianzas de dos conjuntos de datos	26
3.2.3	Comparación de dos conjuntos de resultados con varianzas semejantes	26
3.2.4	Comparación de dos conjuntos de resultados con varianzas diferentes	27
4	CONCLUSIONES	28
5	BIBLIOGRAFÍA	31
	ANEXOS	
	I Técnicas analíticas instrumentales	35
	II Validación y desempeño	37
	III Consideraciones estadísticas	39
	IV Glosario	49
	V Regresión lineal	57

## 1.- INTRODUCCIÓN

Las normas internacionales ISO 9001:2000, ISO 10012:2002, ISO 17025:1999 y las normas mexicanas equivalentes, mencionan la validación como uno de los REQUISITOS TÉCNICOS que los laboratorios deben cumplir para demostrar que: a) operan un Sistema de Calidad, b) son técnicamente competentes y c) son capaces de generar resultados técnicamente válidos.<sup>[1]</sup>

Cuando un laboratorio emplea un método de medición, ya sea de una Norma Oficial Mexicana o Norma Mexicana (NOM o NMX), Internacional (tipo ISO) o de Asociaciones o Laboratorios reconocidos (ASTM, AOAC, EPA, etc.), tiene que demostrar que sus analistas son capaces de alcanzar los parámetros de desempeño marcados en la validación.

Algunos de los factores que determinan el desarrollo correcto y confiable de los ensayos efectuados por un laboratorio<sup>[1]</sup> son:

- Factores humanos (capacitación, certificación, destreza demostrada).
- Instalación y condiciones ambientales (fuentes de energía, iluminación, aire, etc.).
- **Métodos de ensayo, calibración y validación de métodos.**
- Equipos (selección, identificación, calibración, verificación intermedia, factores de corrección, inviolabilidad del ajuste, instrucciones de uso, mantenimiento).
- Trazabilidad de la medición (manejo y uso de patrones, y de materiales de referencia).
- Muestreo (plan y procedimiento de muestreo).
- Transporte, almacenamiento y control de muestras o material a analizar.
- Análisis, revisión y control de los resultados de las mediciones.
- Informes o Certificados de resultados.

Para asegurar que los resultados de las mediciones sean confiables y comparables es necesario contar dentro del Sistema de Calidad con un efectivo Sistema de Control de Mediciones, el cuál se encargue de puntos críticos tales como:

- a) La **confirmación metrológica**<sup>[2,3]</sup> de los instrumentos, comparando los requisitos metrológicos del cliente (RMC) con las características metrológicas del equipo de medición (CMEM) informadas por el laboratorio de calibración,
- b) la **calificación** de equipo de instrumentos analíticos (CEIMA),<sup>[4]</sup>
- c) la **validación** del método de medición,<sup>[5,6,7]</sup>

- d) las pruebas de **aptitud** del sistema (PAS),<sup>[8]</sup>
- e) la estimación de **incertidumbre** en los resultados,<sup>[2,3,9]</sup>
- f) la estimación de **trazabilidad** de los resultados.<sup>[2,3,10]</sup>

Los términos “calificación” y “validación” no deben confundirse, no expresan lo mismo. La calificación está orientada y relacionada primariamente a la operación del instrumento y la validación al método del proceso de medición.<sup>[4]</sup>

**1.1 Métodos de ensayo:** Los laboratorios deben usar métodos y procedimientos apropiados para todos los ensayos incluyendo: muestreo, manejo, transporte, almacenamiento, preparación de la muestra, y cuando aplique estimación de incertidumbre de medición y **las técnicas estadísticas para el análisis de los datos**. Normalmente se usan métodos publicados en Normas Nacionales, Regionales, Internacionales, de Asociaciones Técnicas reconocidas, Publicaciones Científicas importantes, Métodos desarrollados o adaptados por el laboratorio si son apropiados para el uso pretendido y éstos deben estar validados para que cumplan con las necesidades del cliente.<sup>[1]</sup>

**1.2 Validación de métodos:** El químico actual dispone de una enorme serie de técnicas instrumentales para realizar los análisis. La validación de estas técnicas instrumentales es la confirmación mediante el suministro de evidencia objetiva de que se han cumplido los requisitos para una utilización o aplicación específica prevista. Es siempre un balance entre costos, riesgos y posibilidades técnicas.

La validación examina los **parámetros de desempeño** (características de funcionamiento) de un método para identificar y establecer cualquier limitación que pueda esperarse del método cuando se aplique a un tipo específico de muestras, algunos de esos parámetros son:

Intervalo de trabajo/linealidad, sensibilidad, selectividad, robustez, límite de detección, límite de cuantificación, precisión, recuperación, exactitud, incertidumbre, etc..

*El objetivo de este trabajo es describir algunos de estos parámetros y las herramientas estadísticas empleadas para comparar los resultados con los criterios y/o especificaciones a fin de tomar decisiones confiables de aceptación o rechazo al desarrollar una metodología que incluye una técnica instrumental.*

## **2.- ANTECEDENTES**

### **2.1 Técnicas instrumentales**

La química analítica cuantitativa es una ciencia metrológica, se ocupa de los métodos experimentales que determinan la composición química de la materia; informando numéricamente la cantidad relativa de las especies atómicas o moleculares que contiene la muestra, de gran importancia para transacciones económicas de tipo comercial, regulaciones de salud, control de contaminación, de calidad etc. Los métodos analíticos describen la secuencia de actividades, recursos, materiales y parámetros que se deben cumplir, para realizar el análisis de un componente específico de la muestra. Se pueden clasificar en clásicos e instrumentales dependiendo de las técnicas de separación y de las técnicas de determinación de analitos empleados en ellos (tabla 1 anexo I). Los métodos analíticos instrumentales emplean técnicas de separación más complejas y la técnica de determinación utiliza la medida de alguna propiedad física de las sustancias (enumeradas en la tabla 2 del anexo I) para cuantificar una gran variedad de analitos, inorgánicos, orgánicos y bioquímicos. El principio de medición de cada técnica depende de la propiedad usada, conocer ese principio y esas propiedades fisicoquímicas ayudan al analista a conocer el método instrumental y a evaluar las condiciones óptimas de trabajo de los sistemas de medición a utilizar. En las técnicas instrumentales las mediciones se realizan mediante una fuente generadora de señal en el analito a estudiar que estimula un fenómeno físico que nos da una respuesta detectable y cuantificable en un detector. Es útil también conocer que componentes del sistema de medición emplean las técnicas instrumentales (tabla 3 anexo I) ya que éstos influyen sobre los resultados de la medición. Al elegir la técnica instrumental más conveniente entre la gran cantidad que hay de éstas disponibles en el mercado, deben considerarse los requerimientos analíticos y las características o parámetros de desempeño (tabla 1 anexo II), además del tiempo, costo y de que los instrumentos deben calibrarse periódicamente con patrones de trazabilidad conocida o con materiales de referencia certificados.<sup>[11]</sup>

### **2.2 Validación de métodos**

Conviene que previo o en conjunto con la validación se haga; la Confirmación Metrológica (CM), la Calificación de los Instrumentos (CEIMA), los ensayos de aptitud del laboratorio, la calibración, las determinaciones de incertidumbre y de trazabilidad.



La validación de un procedimiento consiste en tres pasos:<sup>[12]</sup>

- a) Establecimiento de las condiciones por cumplir (conforme a criterios y/o requisitos de autoridades o clientes).
- b) Determinación de los parámetros de desempeño del procedimiento.
- c) Valoración de los resultados de la validación, comparación de los parámetros obtenidos con las condiciones establecidas y decisión de la validez del procedimiento para el propósito establecido.

Las condiciones por cumplir para la primera parte de la validación las fija el cliente o la normatividad existente, la segunda parte el responsable de la validación como se menciona a continuación y la tercera parte se hace empleando técnicas estadísticas.

El objetivo y el alcance de la validación (tabla 2 anexo II) deben ser determinados por el responsable del ensayo. Los parámetros por determinar y en caso necesario, los principios aplicados deben ponerse por escrito en un Informe de Validación. En algunas circunstancias (tabla 3 anexo II) se requieren evaluar todos los parámetros y en otras no, en muchos casos, por falta de información sólo pueden darse en forma simplificada. La confiabilidad de los resultados de una medición, es el factor de mayor importancia para la toma de decisiones, es una declaración de conformidad o no conformidad con el requisito establecido por una norma o cliente, puede estar soportado<sup>[2,3]</sup> por:

- a) El examen directo de un atributo,
- b) la conclusión sobre un atributo a partir de resultados de medición, o
- c) la realización directa de mediciones.

El tercer paso de la validación es, valorar los parámetros de desempeño obtenidos de los resultados, compararlos contra los criterios o especificaciones del procedimiento para el propósito establecido y dictaminar sobre la aceptación, rechazo o de la necesidad de modificar el método validado.

En el anexo III se describen términos y herramientas estadísticas que ayudan a realizar dicho dictamen con mayor confiabilidad.

### **3.- DISCUSIÓN**

#### **3.1 PARÁMETROS DE DESEMPEÑO EN LA VALIDACIÓN DE METODOLOGÍAS INSTRUMENTALES.**

La validación del método se considera distinta a las actividades realizadas en forma continua tales como el control de calidad interno, o las pruebas de aptitud del

La validación de un procedimiento consiste en tres pasos:<sup>[12]</sup>

- a) Establecimiento de las condiciones por cumplir (conforme a criterios y/o requisitos de autoridades o clientes).
- b) Determinación de los parámetros de desempeño del procedimiento.
- c) Valoración de los resultados de la validación, comparación de los parámetros obtenidos con las condiciones establecidas y decisión de la validez del procedimiento para el propósito establecido.

Las condiciones por cumplir para la primera parte de la validación las fija el cliente o la normatividad existente, la segunda parte el responsable de la validación como se menciona a continuación y la tercera parte se hace empleando técnicas estadísticas.

El objetivo y el alcance de la validación (tabla 2 anexo II) deben ser determinados por el responsable del ensayo. Los parámetros por determinar y en caso necesario, los principios aplicados deben ponerse por escrito en un Informe de Validación. En algunas circunstancias (tabla 3 anexo II) se requieren evaluar todos los parámetros y en otras no, en muchos casos, por falta de información sólo pueden darse en forma simplificada. La confiabilidad de los resultados de una medición, es el factor de mayor importancia para la toma de decisiones, es una declaración de conformidad o no conformidad con el requisito establecido por una norma o cliente, puede estar soportado<sup>[2,3]</sup> por:

- a) El examen directo de un atributo,
- b) la conclusión sobre un atributo a partir de resultados de medición, o
- c) la realización directa de mediciones.

El tercer paso de la validación es, valorar los parámetros de desempeño obtenidos de los resultados, compararlos contra los criterios o especificaciones del procedimiento para el propósito establecido y dictaminar sobre la aceptación, rechazo o de la necesidad de modificar el método validado.

En el anexo III se describen términos y herramientas estadísticas que ayudan a realizar dicho dictamen con mayor confiabilidad.

### **3.- DISCUSIÓN**

#### **3.1 PARÁMETROS DE DESEMPEÑO EN LA VALIDACIÓN DE METODOLOGÍAS INSTRUMENTALES.**

La validación del método se considera distinta a las actividades realizadas en forma continua tales como el control de calidad interno, o las pruebas de aptitud del

laboratorio. La validación del método se lleva a cabo una sola vez, o a intervalos planteados en el sistema de calidad del laboratorio, durante la vigencia de un método; informa qué desempeño se puede esperar que proporcione a futuro dicho método. El control de calidad interno informa sobre cómo se desempeña el método con el tiempo. Algunas Instituciones internacionales plantean que la validación debe referirse a un "sistema analítico" en vez de a un "método analítico"; el sistema analítico comprendería: un protocolo del método definido, un intervalo de concentración definido para el analito, y un tipo especificado de material de prueba.<sup>[7]</sup>

La validación del método hace uso de una serie de pruebas que al mismo tiempo que comprueban cualquier suposición en la que el método analítico se basa, también establecen y documentan los parámetros del desempeño del método, y con ello demuestran si éste se ajusta adecuadamente a un propósito analítico particular a lo largo del intervalo de concentraciones del analito y de los materiales de prueba a los que se aplica. Los parámetros de desempeño típicos de los métodos analíticos son: **aplicabilidad, selectividad, intervalo de trabajo/linealidad, calibración, precisión (repetibilidad, reproducibilidad), recuperación, límite de cuantificación, límite de detección, sensibilidad, robustez/desigualdad y exactitud.** A los que pueden agregarse la incertidumbre de medición y la aptitud hacia un propósito. Estas características junto con la declaración de cualquier criterio o especificaciones a cumplir deben ser completamente especificadas en un procedimiento de validación antes de su realización.<sup>[7]</sup> En el proceso de asignar un valor determinado a un criterio se requieren operaciones tales como: repetir las mediciones de los parámetros, comparar unos resultados con otros, confirmar o rechazar hipótesis siendo la Estadística una herramienta fundamental para la extracción de información química.<sup>[13]</sup>

Los estudios colaborativos tienen como objetivo evaluar un método analítico estableciendo cuales son sus principales cualidades o bien comparar métodos entre sí. Mediante ellos se puede saber si un método es técnicamente robusto, cual es su alcance y limitaciones, cuales son sus parámetros de desempeño o bien conocer si el procedimiento utilizado está descrito con claridad suficiente.<sup>[13]</sup>

Para tratar de evitar la confusión que surge de la terminología usada por diversos sectores involucrados se incluyen algunas de las definiciones encontradas en bibliografía y algunos términos equivalentes (ver Glosario del anexo IV).

### **3.1.1 CONDICIONES ÓPTIMAS DE TRABAJO.**

Para todos los métodos analíticos se recomienda la evaluación de la adecuabilidad del sistema ya que permite verificar que el sistema de medición funcione apropiadamente, independientemente de las condiciones ambientales,<sup>[14]</sup> esto implica hacer, la **confirmación metrológica** de los instrumentos, y la **calificación** de equipo de instrumentos analíticos.<sup>[4]</sup> Los fabricantes de instrumentos o sistemas de medición generalmente suministran especificaciones y procedimientos escritos, además existen normas y publicaciones para técnicas específicas de análisis <sup>[5,15,16,17,18]</sup> que guían al analista a seleccionar las condiciones óptimas de operación para el mejor desempeño del sistema de medición, tales como resolución, longitud de onda, velocidad de barrido, columna de separación, flujo, constantes de celda, gradientes de temperatura, entre otros. Que podrán establecerse o confirmarse realizando por ejemplo las pruebas de selectividad, sensibilidad, robustez y recobro.

### **3.1.2. CONFIRMACIÓN DE IDENTIDAD Y SELECTIVIDAD/ESPECIFICIDAD.**

**3.1.2.1 ¿QUÉ ES?** En general los métodos analíticos consisten de una etapa de medición que puede, o no, ser precedida por una etapa de separación. Es necesario establecer que la señal producida en la etapa de medición, u otra propiedad medida sólo sea debida al analito y no a la presencia de algo química o físicamente similar o, que se haya presentado como una coincidencia. Ésta es la **confirmación de identidad**.

Si otros compuestos interfieren o no con la medición del analito dependerá de la efectividad de la etapa de separación y de la selectividad/especificidad de la etapa de medición. La **selectividad y la especificidad** son medidas que evalúan la confianza de las mediciones en presencia de interferencias. Generalmente se considera que la especificidad es la selectividad al 100% pero este acuerdo no es universal.<sup>[6]</sup>

**3.1.2.2 ¿CÓMO SE DETERMINA Y CALCULA?** La aplicabilidad del método debe ser estudiada usando varias muestras; desde sustancias patrón puras hasta mezclas con matrices complejas. En cada caso la recuperación del analito(s) de interés debe ser determinada y las influencias de las interferencias sospechosas debe declararse debidamente.<sup>[19]</sup> Es poco práctico considerar o probar cada interferencia potencial; se recomienda que se verifiquen sólo los peores casos probables. De acuerdo a la experiencia que se tenga en el análisis de la muestra, se deben establecer las

sustancias potencialmente interferentes (estructura molecular similar a la del analito, precursores, productos de degradación), adicionar cantidades conocidas de éstas, solas o combinadas a la muestra y evaluar su respuesta al método, bajo las mismas condiciones de análisis. Cuando no se disponga de las posibles impurezas interferentes para agregarlas a las muestras, el analito debe someterse a condiciones que generen su inestabilidad química (luz, calor humedad, hidrólisis ácido-básica y oxidación).<sup>[14]</sup>

**Confirmación de la identidad y selectividad/especificidad.<sup>[6,12]</sup>**

¿Qué hacer?	veces ?	Calcular / determinar	Comentarios
Se analiza por dos métodos, el que se está evaluando y otro método independiente, o, cuando aplique, modificar el sistema de separación del método en evaluación. (Ej. cambió de la fase móvil y/o fase estacionaria en cromatografía); es muy baja la probabilidad de que la misma interferencia produzca en ambos casos el mismo error en los resultados.			
Analizar las muestras, y los materiales de referencia por el método en estudio y otros métodos independientes.	1	Usar los resultados de las técnicas de confirmación y evaluar la habilidad del método para confirmar la identidad del analito y su habilidad de medir el analito separado de otras interferencias.	Decidir cuánta evidencia de apoyo es razonablemente requerida para dar la suficiente confiabilidad.
Se agrega a la muestra del analito, en cantidades sucesivas, el componente que interfiere y se evalúa su influencia o se prueba un material de referencia certificado de la matriz agregándole cantidades conocidas del analito a niveles que incluyan el valor especificado o esperado en la muestra.			
Analizar muestras que contengan varias interferencias sospechosas en presencia de los analitos de interés.	1	Examinar si el efecto de las interferencias refuerza o inhibe la detección o cuantificación del mensurando.	Si la detección o la cuantificación se inhibe por las interferencias, se requerirá el desarrollo posterior del método.
Algunos protocolos de validación confunden la confirmación de identidad con la repetibilidad. Considerando que la repetibilidad requiere realizar la medición varias veces por una técnica, la confirmación (es decir la identificación del analito) requiere realizar la medición por más de una técnica. La confirmación aumenta la confianza en la técnica bajo examen y es especialmente útil cuando las técnicas adicionales operan en principios significativamente diferentes.			

**3.1.2.3 ¿CRITERIOS DE ACEPTACIÓN?** Las interferencias presentes que no puedan separarse del analito de interés, o las interferencias desconocidas o inesperadas, pueden hacer que los resultados analíticos sean demasiado altos o demasiado bajos. Algunos métodos normalizados<sup>[20]</sup> se acompañan de tablas que describen las posibles interferencias y sus posibles causas, anulación o compensación de sus efectos en la medición. Las interferencias usualmente afectarán diferentemente la **pendiente de la curva de calibración** respecto al analito de interés, de modo que dicha pendiente en el método de adiciones puede afectar la linealidad de la curva. Este efecto tiene el potencial de indicar la posible presencia de interferencias ocultas, pero no ayuda si la curva de recuperación es inherentemente no lineal.<sup>[6]</sup> La selectividad es esencialmente

una valoración cualitativa, sin embargo hay medidas cuantitativas útiles una de ellas es el **índice de selectividad**  $b_{an}/b_{int}$  dónde  $b_{an}$  es la sensibilidad del método (la pendiente de la función de calibración) y  $b_{int}$  la pendiente de la respuesta independientemente producida por una interferencia potencial.<sup>[17]</sup>

Si distintos procedimientos dan lugar a resultados considerablemente diferentes es probable que exista una interferencia. Como principio general, la selectividad debe ser suficientemente buena para que cualquier interferencia sea ignorada. La respuesta del método debe ser debida al analito, la comparación de resultados obtenidos y esperados se hace mediante técnicas estadísticas.

**3.1.2.4 ¿DECISIONES A TOMAR?** Cuando la detección o cuantificación del analito sea inhibida o incrementada considerablemente por las interferencias es conveniente modificar el método o desarrollar uno nuevo. Cualquier restricción en la aplicabilidad de la técnica debe ser documentada en el método.<sup>[19]</sup>

### **3.1.3 INTERVALO DE TRABAJO, LINEALIDAD Y CALIBRACIÓN.**

**3.1.3.1 ¿QUÉ ES?** El **intervalo de trabajo** de un método se establece examinando muestras con diferentes concentraciones del analito y determinando el intervalo de concentración para el cual puede lograrse una incertidumbre aceptable. El intervalo de trabajo se refiere al intervalo de valores de concentración en las disoluciones que se miden realmente y no a la concentración en la muestra original. El intervalo de trabajo es generalmente de mayor alcance que el **intervalo lineal**, el cual se establece analizando un número de muestras con varias concentraciones del analito y calculando la regresión de los resultados, normalmente usando el **método de mínimos cuadrados** (ver anexo V). La relación entre la respuesta del analito y la concentración no tiene que ser absolutamente lineal para que un método sea efectivo aunque si debe demostrarse que tiene repetibilidad día a día.<sup>[2,3,6,19]</sup> Al establecer el **intervalo de trabajo** de los métodos de medición se debe tomar en cuenta: **a)** los límites máximos permisibles o, **b)** las especificaciones de la norma o regulación a cumplir o, **c)** las especificaciones de procesos que se estén evaluando o, **d)** los requerimientos de los clientes del laboratorio; los que idealmente deben estar en la sección media del intervalo de trabajo. Por ejemplo, si el límite máximo permisible de Pb en agua potable es de 0,01 mg/L, el intervalo de trabajo ideal es de 0,002 a 0,05 mg/L.<sup>[2,3]</sup>

**La linealidad** define la habilidad del método para asegurar que los resultados obtenidos directamente o por medio de la transformación matemática definida sean resultados proporcionales a la concentración del analito en la prueba. Se infiere que el intervalo lineal es el *intervalo de concentraciones del analito sobre las cuales el método proporciona resultados de pruebas proporcionales a la concentración del analito.*<sup>[2,3,6,11,14]</sup> va desde la concentración mas pequeña (LC) a la que se puede trabajar en medidas cuantitativas hasta la concentración a la que la curva de calibración se desvía de la linealidad límite (LL).<sup>[11]</sup> Los cálculos de regresión en si mismos son insuficientes para demostrar la linealidad, conviene además hacer una inspección visual de la grafica obtenida y de los residuales. a esa gráfica se le llama curva de calibración.

La **curva de calibración**<sup>[21,22]</sup> se realiza con un material de referencia o un reactivo de alta pureza del analito que se desea cuantificar. Como ejemplo en cromatografía consiste en obtener un factor de respuesta del detector en base a la relación respuesta-área del estándar a diferentes concentraciones. Se debe realizar una curva de calibración para cada analito con un material de referencia certificado o en su defecto se adiciona el analito (sustancia química de alta pureza) a una matriz similar a la de la muestra, y en el caso de muestras complejas se puede dividir una muestra en dos submuestras, se utiliza una submuestra como blanco y a la otra se le adiciona el analito en cantidad conocida (spike). La curva de calibración es la herramienta de medición que proporciona resultados más confiables en la técnica analítica de cromatografía de líquidos pero si está mal calculada generará resultados erróneos por lo cual el control de la calidad de la curva de calibración es un punto crítico en las Buenas Prácticas de Laboratorio.<sup>[23]</sup>

A veces los términos calibración y estandarización se confunden y se usan indistintamente, calibración significa comprobar la respuesta de un instrumento con un material de propiedades conocidas y quizás aplicar un factor de corrección para llegar a la marca correspondiente. Por otro lado estandarizar significa caracterizar la respuesta de un instrumento según las propiedades conocidas del material. En química instrumental los sistemas de medición constan de diferentes partes que sería complicado calibrar una a una, por lo que se recurre al calibrado global (estrictamente, a la estandarización de la respuesta) mediante una serie de disoluciones de concentraciones conocidas.<sup>[13]</sup> Casi todos los métodos instrumentales, requieren una

calibración, proceso que relaciona la señal analítica medida con la concentración del analito. Los tres métodos mas frecuentes usados son la realización y el uso de una curva de calibración, el método de la adición de estándar y el método del patrón interno.<sup>[11]</sup>

### 3.1.3.2 ¿CÓMO SE DETERMINA/CALCULA?

#### Intervalo de trabajo y linealidad.<sup>[6,19]</sup>

Analizar	Replicas	Qué calcular de los datos	Comentarios
1) Muestra blanco más los materiales de referencia o muestras blanco fortificadas a varias concentraciones. Se necesitan por lo menos 6 concentraciones más la muestra blanco.	1	-Hacer gráfica de la respuesta de medición (el eje y) contra la concentración del mensurando (el eje x).	Idealmente las diferentes concentraciones deben prepararse independientemente, y no de alicuotas de la misma solución patrón.
		-Visualmente examinar para identificar el intervalo lineal aproximado y los límites superior e inferior del intervalo de trabajo.  -Entonces ir a 2).	Esto dará la confirmación visual de si o no el intervalo de trabajo es lineal.
2) Materiales de referencia o muestras blanco fortificadas por lo menos 6 diferentes concentraciones dentro del intervalo lineal.	3	-Hacer gráfica de la respuesta de medición (el eje y) contra la concentración del mensurando (el eje x).	Esta etapa es necesaria para probar un intervalo de trabajo que se piensa que es lineal y donde se usa la calibración en un solo punto.
		-Visualmente examinar los valores aberrantes que no deben reflejarse en la regresión.	No se pueden quitar los aberrantes sin comprobar primero, usando determinaciones adicionales a concentraciones cercanas.
		-Calcular el coeficiente de regresión apropiado. Calcular y hacer gráfica de los valores residuales (la diferencia entre valor real de y el valor de y predicho por la línea recta, para cada valor de x). La distribución aleatoria sobre la línea recta confirma la linealidad. Las tendencias sistemáticas indican la no linealidad. -Entonces ir a 3).	Si la varianza de las réplicas es proporcional a la concentración entonces se usa un cálculo de regresión ponderado en lugar de una regresión no-ponderada. En ciertas circunstancias puede ser mejor intentar ajustar una curva no lineal a los datos. Generalmente no se aconsejan funciones superiores a las cuadráticas.
3) Determina límite de cuantificación LC como se explica en 3.1.7.2 (b).		Como se explica para LC en 3.1.7.2 (b). A partir de LC se forma el extremo inferior del intervalo de trabajo.	Trabajar consecutivamente con concentraciones más bajas hasta que la exactitud y la precisión sean inaceptables.

Para métodos que muestran buena linealidad es usualmente suficiente trazar una curva de calibración usando patrones de medición a cinco niveles diferentes de concentración (más la muestra blanco), donde la linealidad sea pobre se requerirán más patrones de medición.<sup>[19]</sup> La curva de calibración debe hacerse con:



- Cinco o más soluciones patrón de calibración;
- las soluciones patrón de calibración deben espaciarse uniformemente sobre el intervalo de concentración de interés;
- el intervalo debe abarcar 0–150% o 50–150% de la concentración a ser probablemente encontrada, dependiendo cuál de éstos es el más conveniente;
- las soluciones patrón de calibración deben leerse por lo menos por duplicado, y preferentemente por triplicado o más, en orden aleatorio.

**3.1.3.3 ¿CRITERIOS DE ACEPTACIÓN?** La calibración funciona verosímilmente si (a) es lineal, (b) pasa a través del origen, y (c) no es afectada por la matriz del material de prueba de acuerdo a cálculos, pruebas de hipótesis y conclusiones realizados (indicados el anexo V)

**3.1.3.4 ¿DECISIONES A TOMAR?** Una vez que se establece en la validación que una función de calibración es lineal y pasa a través del origen, puede usarse como rutina, una estrategia de calibración mucho más sencilla (por ejemplo, un diseño de réplicas a dos-puntos).<sup>[7]</sup> La evaluación del intervalo de trabajo y del intervalo lineal es útil para planear el grado de calibración que requiere usar el método rutinariamente. Es aconsejable investigar la variación a lo largo del intervalo de trabajo. Dentro del intervalo lineal, un punto de la calibración con el origen puede ser suficiente, para establecer la pendiente de la línea de la calibración, siempre y cuando caiga dentro del intervalo de confianza determinado en una curva de calibración previa. En otra parte del intervalo de trabajo, la calibración multi-punto (preferentemente 6 puntos más el blanco) será necesaria. La relación de respuesta del instrumento a la concentración no tiene que ser absolutamente lineal para que un método sea eficaz pero la curva debe ser repetible día a día. Hay que notar que el intervalo de trabajo y el intervalo lineal pueden ser diferentes para matrices diferentes según el efecto de interferencias que surjan de la matriz.<sup>[14]</sup>

Si la relación entre señal y concentración no es lineal puede ser extremadamente complejo encontrar la función de calibración correspondiente. Es más práctico reducir el intervalo de trabajo del procedimiento al intervalo de linealidad que exista, otra opción es demostrar que la curva de calibración repetible día con día.<sup>[13]</sup>

A la pendiente de la recta se le llama de muchas maneras: factor de respuesta, coeficiente de extinción, es un índice de la sensibilidad del procedimiento analítico, con

la precisión de la pendiente y de la ordenada en el origen se pueden calcular el límite de detección y el de cuantificación.<sup>[13]</sup>

### **3.1.4 PRECISIÓN (REPETIBILIDAD Y REPRODUCIBILIDAD).**

**3.1.4.1 ¿QUÉ ES? Precisión** es la proximidad de la concordancia entre resultados de ensayos mutuamente independientes cuyos valores de magnitud son obtenidos por mediciones repetidas de una magnitud bajo condiciones específicas. La precisión es el componente aleatorio de la incertidumbre. La **repetibilidad** y la **reproducibilidad** son mediciones de precisión realizadas a condiciones extremas prescritas, la primera describe la mínima variabilidad; lo que se conoce como **precisión intermedia** es la reproducibilidad de un laboratorio en particular.

Tanto la precisión de medición, como la repetibilidad, la reproducibilidad y la precisión intermedia se expresan numéricamente por medidas de imprecisión tales como la desviación estándar, la varianza, o la desviación estándar relativa (coeficiente de variación), bajo condiciones específicas de medición. A mayor desviación estándar menor precisión. La precisión depende únicamente de la distribución de los errores aleatorios; no tiene relación con el valor verdadero. Generalmente depende de la concentración del analito, lo cual debe determinarse y documentarse.<sup>[6.7.9.11.14]</sup>

Las dos medidas de precisión más comunes son la repetibilidad y la reproducibilidad, representan las dos medidas extremas de la precisión que pueden obtenerse. La repetibilidad (la precisión máxima esperada) da una idea de la clase de variabilidad interna que se espera para un laboratorio cuando un método ha sido realizado por un solo analista en un solo equipo, en períodos de tiempo corto, es decir la clase de variabilidad que se espera entre los resultados cuando una muestra se analiza por duplicado.

**3.1.4.2 ¿CÓMO SE DETERMINA/CALCULA?**<sup>[24]</sup> La precisión y por tanto la repetibilidad y la reproducibilidad son generalmente dependientes de la concentración del analito, y debieran determinarse a varias concentraciones, esta suposición necesita ser verificada. Si se espera que el nivel del analito varíe substancialmente (es decir, por más de aproximadamente 30% de su valor central), la relación entre la precisión y la concentración del analito (desviación estándar proporcional o linealmente dependiente al nivel del analito), debe establecerse. La desviación estándar relativa (coeficiente de variación) es muy útil en este caso porque permanece constante en el intervalo de

interés proporcionado.<sup>[6]</sup> Al hacer la validación las condiciones que se proponen cambiar entre corridas de mediciones deben representar lo que normalmente sucedería en el laboratorio bajo el uso rutinario del método, por ejemplo, variaciones en los lotes de reactivos, analistas, e instrumentos.

El material de prueba usado debe ser típico, por lo que se refiere a la matriz, de los materiales probablemente encontrados en la aplicación rutinaria. Así los materiales de prueba reales o, en un grado menor, los materiales de referencia de matriz semejante, serían las soluciones convenientes, en vez de las soluciones patrón del analito.

En el vocabulario internacional de metrología se exponen hasta 6 tipos distintos de factores que pueden cambiarse acompañados de las especificaciones que se deben de cumplir para que la dispersión de los datos obtenidos sea una medida cuantitativa de reproducibilidad. Entre estas condiciones se especifican por ejemplo, la reproducibilidad entre días, entre laboratorios o entre analistas.

**Repetibilidad y reproducibilidad de la precisión.<sup>[6,12]</sup>**

Análisis	Repeticiones (independientes)	Qué calcular de los datos	Comentarios
Sustancias patrón, materiales de referencia o muestras blanco fortificadas a varios concentraciones a lo largo del intervalo de trabajo			
a) Mismo analista, mismo equipo, mismo laboratorio, breve lapso de tiempo.	10	Determina la desviación estándar (s) a cada concentración.	Determina la desviación estándar de la repetibilidad a cada concentración.
b) Diferentes analistas, diferentes equipos, mismo laboratorio, amplio lapso de tiempo.	10	Determina la desviación estándar (s) a cada concentración.	Determina la desviación estándar de la precisión intermedia (Reproducibilidad intralaboratorio) a cada concentración.
c) Diferentes analistas, diferentes equipos, diferentes laboratorios, amplio lapso de tiempo.	10	Determina la desviación estándar (s) a cada concentración.	Determina la desviación estándar de la reproducibilidad interlaboratorio a cada concentración. Requiere estudio de colaboración.
Deben determinarse suficientes resultados (se recomienda $n \geq 10$ ).			
La determinación de reproducibilidad tiene sentido y es posible solamente cuando otros laboratorios cercanos utilizan el método de ensayo y es posible una intercomparación interlaboratorios o cuando se realiza un ensayo de intercomparación. <sup>[12]</sup>			

Probablemente lo más económico sería hacer la valoración simple de la precisión en las cercanías de los extremos del intervalo de trabajo, con una prueba estadística F para la diferencia en la varianza para errores con distribución normal.<sup>[7]</sup>

Para **evaluar la Precisión** pueden compararse las varianzas de las muestras correspondientes a los niveles de concentración más altos y más bajos mediante la

**Prueba F** (anexo III) para saber si hay una diferencia significativa. Si esta prueba indica que hay diferencias, se construye un gráfico de la desviación estándar respecto a la concentración para ver si ésta es constante o proporcional a la concentración. En este último caso, si la desviación estándar relativa (coeficiente de variación) es constante, su valor medio de todas las muestras proporcionará una estimación de la precisión del método.<sup>[13]</sup>

Si la prueba F no muestra diferencias significativas entre las desviaciones estándar de las concentraciones más altas y más bajas, se puede concluir que la desviación estándar es constante, en este caso puede obtenerse una desviación estándar global calculada a partir de la siguiente expresión:<sup>[13]</sup>

$$s^2 = \frac{\sum n_i s_i^2}{\sum n_i - K}$$

Donde s es la desviación estándar, n es el número de réplicas de la muestra *i*,  $s_i^2$  su varianza y k el número de muestras analizadas (número de concentraciones diferentes usadas).

**3.1.4.3 ¿CRITERIOS DE ACEPTACIÓN?** Las desviaciones estándar o coeficientes de variación calculadas para cada caso se comparan contra los valores especificados (ejemplo, 2% para el CV para métodos cromatográficos en validaciones farmacéuticas), o se comparan entre sí para determinar si son diferentes, menores o iguales de acuerdo a la hipótesis alterna elegida en la prueba de hipótesis usando un estadígrafo de contraste como se indica en el anexo III).

**3.1.4.4 ¿DECISIONES A TOMAR?** Documentar en el informe de validación si existe o no proporcionalidad de la desviación estándar encontrada y la concentración del analito así como el método empleado para calcular la precisión. Si los resultados no fueran aprobatorios, cambiar el método de acuerdo a los resultados obtenidos o si fuera el caso justificar que se continúe en uso con el apoyo técnico disponible.

### **3.1.5 SENSIBILIDAD.**

**3.1.5.1.- ¿QUÉ ES?** La Sensibilidad de un instrumento o de un método depende del mensurando, es una medida de la capacidad del método de diferenciar pequeñas variaciones en la concentración del analito. Dos factores la limitan: la pendiente de la

curva de calibración y la precisión (repetibilidad y reproducibilidad) del sistema de medición.

**3.1.5.2 ¿CÓMO SE DETERMINA/CALCULA?** La sensibilidad de calibración se define por la pendiente de la curva de calibración a la concentración objeto de estudio y puede ser determinado por un procedimiento de mínimos cuadrados, experimentalmente, usando muestras de diferentes concentraciones de analito. La sensibilidad de calibración es independiente a la concentración del analito y es igual a la pendiente "m" obtenida preferentemente de la función de calibración para el método analítico completo. Como parámetro de calidad tiene el inconveniente de no tomar en cuenta las medidas individuales. Dividiendo la pendiente de la recta entre la desviación estándar de las mediciones ("s") se obtiene la **sensibilidad analítica** que tiene la ventaja de ser insensible a los factores de amplificación además de que es independiente de las unidades de medida de la señal pero tiene la desventaja de que depende de la concentración ya que puede variar con ella.<sup>[11]</sup>

**3.1.5.3 ¿CRITERIOS DE ACEPTACIÓN?** Entre dos métodos que tengan igual precisión será más sensible aquel cuya curva de calibración tenga mayor pendiente; si dos métodos tienen curva de calibración con igual pendiente, será más sensible aquel que presente la mayor precisión. La sensibilidad de un método es la pendiente de la función de la calibración. Como esto normalmente es arbitrario, dependiendo de los montajes instrumentales, no es útil en la validación. Sin embargo puede utilizarse en los procedimientos de aseguramiento de calidad, para probar si un instrumento está funcionando a un nivel consistente y satisfactorio. La sensibilidad a veces se usa para referirse a un límite de detección pero este uso generalmente no es aprobado.<sup>[7]</sup>

**3.1.5.4 ¿DECISIONES A TOMAR?** Usualmente es deseable maximizar el valor de la sensibilidad, a menos que se quiera extender el intervalo de respuesta del instrumento sin diluir la muestra. Cuando se comparan diferentes técnicas o instrumentos se debe estar consciente de los procedimientos usados en la práctica para llegar a los valores de sensibilidad. Cambios en la sensibilidad (pendiente de la recta) indican la presencia de interferencias. A medida que la concentración de la especie analizada tiende a cero la señal desaparece confundándose con el ruido rebasando los límites de cuantificación y de detección. La inestabilidad se calcula haciendo la regresión lineal de la señal medida contra el tiempo: la pendiente de la recta indicará la deriva (parte

sistemática) y la desviación estándar de los residuales será la dispersión (parte aleatoria).

### 3.1.6 LÍMITE DE DETECCIÓN (LD / LoD).

**3.1.6.1 ¿QUÉ ES?** En los resultados analíticos que están muy cercanos al valor de una muestra blanco, se plantea la duda de si el valor obtenido corresponde a valores aleatorios del blanco o a la presencia real del analito, pues lo que se conoce como la señal de fondo exhibe ruido y es producida por el blanco. El **límite de detección** es la menor concentración del analito en una muestra que puede detectarse, pero no necesariamente cuantificarse bajo las condiciones establecidas de la prueba.<sup>[2,6,14]</sup>

**3.1.6.2 ¿CÓMO SE DETERMINA/CALCULA?** El límite de detección (LD) corresponde a una señal k veces la desviación estándar del ruido del fondo: típicamente el valor de k es igual a 3. Para determinarla experimentalmente existen varias opciones se enumeran algunas de ellas.<sup>[6]</sup>

**Límite de detección (LD). Referencia rápida.<sup>[11]</sup>**

Qué analizar	Qué calcular de los datos	Comentarios
a) Medir una vez cada una de 10 muestras blanco independientes  6	La media y la desviación estándar de la serie de muestras.  Expresar el límite de detección LD, como la concentración o cantidad del analito correspondiente, calculada con la ecuación: a) $LD = x_{bl} + k s_{bl}$  b) $LD = 0 + k s_{bl}$	Dónde: $x_{bl}$ es la media de las medidas del blanco, $s_{bl}$ la desviación estándar de las medidas del blanco, k es un factor numérico escogido según el nivel de confianza deseado (t de student a un determinado nivel de confianza a n-1 grados de libertad donde n debe ser mínimo de 7 lecturas, aunque 10 es lo aconsejable). La propuesta a) sólo es útil donde la muestra blanco da una desviación estándar diferente de cero.
b) Medir una vez cada una de 10 muestras blanco independientes fortificadas a la concentración más baja aceptable.		
c) Medir una vez cada una de 10 muestras blanco independientes fortificadas la concentración más baja aceptable.	$LD = x_{bl} + 4.65 s_{bl}$ (según pruebas de hipótesis).	
La concentración aceptable más baja se considera como la concentración más baja para la que puede lograrse un grado aceptable de incertidumbre (entre 2.5 y 5 veces el límite de detección instrumental reportado por el fabricante del instrumento o la especificación de la prueba de impurezas límite).		
d) Para métodos que utilizan para medir, una respuesta analítica y que presentan una señal de ruido basal se determina la respuesta de muestras blanco y la respuesta de muestras analíticas en un intervalo de concentraciones del analito que incluya la especificación de la prueba de impurezas límite. Determinar aquella cantidad del analito que genera una respuesta con respecto a la muestra blanco en una proporción de 3 a 1 que corresponde a la concentración asociada al límite de detección. <sup>[14]</sup> Esta propuesta asume que una señal sobre la muestra blanco mayor a 3s sólo podría venir de la muestra blanco mucho menos de 1% de las veces, y por lo tanto probablemente haya surgido de algo más, tal como el mensurando.		
Obtener una muestra blanco verdadera puede ser difícil. Tanto el promedio como la desviación estándar de la muestra blanco son dependientes de la matriz que contenga. Si las mediciones se hacen bajo condiciones del repetibilidad, esto también da una medida de la precisión de la repetibilidad.		

**3.1.6.3 ¿CRITERIOS DE ACEPTACIÓN?** Para propósitos de validación en general, es suficiente con indicar a que nivel de concentración la detección se hace crítica o problemática para asegurar que cuando se trabaja a concentraciones mayores los valores por encima de LD pueden ser atribuidos a la presencia del analito y los valores por debajo del LD son indicativos de la ausencia de analito en cantidades detectables. Cuando se trabaja con analitos en cantidades minúsculas o trazas, el analista se enfrenta a dos problemas: señalar que un analito se encuentra presente, cuando en realidad está ausente, y expresar que un analito está ausente cuando no lo está, es requisito en esos casos determinar el límite de identificación. Para el caso de determinaciones de impurezas límite el LD debe ser menor a la especificación. El análisis y la comparación entre resultados obtenidos y las especificaciones o resultados esperados se hace mediante técnicas estadísticas.

**3.1.6.4 ¿DECISIONES A TOMAR?** En algunos laboratorios, es práctica común evaluar separadamente la muestra y el blanco para después corregir restando la concentración del analito correspondiente a la señal del blanco de la concentración correspondiente a la señal de la muestra, hacerlo o no debe estar documentado en el método. Cuando las regulaciones son estrictas o se trabaja a nivel de impurezas se usan curvas patrón y análisis de regresión a bajas concentraciones para determinar los límites de detección. Se debe especificar en el informe de validación, el método aplicado para su cálculo.<sup>[14]</sup>

### **3.1.7 LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN LC/LoQ.**

**3.1.7.1 ¿QUÉ ES?** También conocido como límite de determinación, se requiere conocerlo cuando se realizan mediciones de analitos a nivel de trazas, el **límite de cuantificación** es la menor cantidad que puede ser determinada cuantitativamente con una incertidumbre asociada para un nivel de confianza dado. Para el análisis cuantitativo debe quedar absolutamente claro que sólo se emplean valores atribuibles al analito. El límite de cuantificación está entre 3 y 10 veces el LD según cada caso.<sup>[11,14]</sup>

**3.1.7.2 ¿CÓMO SE DETERMINA/CALCULA?** El límite de cuantificación (LC) corresponde a una señal  $k$  veces la desviación estándar del ruido del fondo, típicamente el valor de  $k$  es igual a 10. Para determinarla experimentalmente existen varias opciones.<sup>[11,14]</sup> Se enumeran a continuación algunas de ellas:

**Límite de Cuantificación (LC). Referencia rápida.**<sup>[6,14]</sup>

Qué analizar	Qué calcular de los datos	Comentarios
a) Medir una vez cada una, de 10 muestras blanco independientes.	Calcular la desviación estándar de los valores de la muestra blanco.  El límite de cuantificación, expresado como concentración, o como cantidad, LC para un procedimiento analítico dado se calcula por la ecuación: $LC = x_{bl} + k s_{bl}$	Donde $x_{bl}$ es la media de las medidas del blanco, $s_{bl}$ la desviación estándar de las medidas del blanco, y $k$ es un factor numérico escogido según el nivel de confianza (5, 6 ó 10). Obtener el valor verdadero del blanco es tarea difícil. Tanto el promedio como la desviación estándar de la muestra blanco son dependientes de la matriz que contenga.
b) Fortificar alicuotas de una muestra blanco a varias concentraciones cercanas al LD.  Medir una vez cada una de las 10 replicas independientes para cada nivel de concentración.	Calcular la desviación estándar, $s$ del analito para cada concentración.  Hacer una gráfica de $s$ contra concentración. Asignar un valor a LC por inspección de la gráfica obtenida.	Expresar LC como la mínima concentración de analito que pueda determinarse a un nivel de incertidumbre aceptable.
c) Para métodos que utilizan para medir una respuesta analítica y que presentan una señal de ruido basal el analista debe determinar la señal de respuesta de muestras blanco y de muestras analíticas en un intervalo de concentraciones conocidas del analito que incluya la especificación de la prueba de impurezas límite. Determinar aquella cantidad del analito cuya señal sea similar a la de la muestra blanco en una proporción de 10 a 1 que corresponde a la concentración asociada al límite de cuantificación. Verificar el valor estimado evaluando la exactitud y la repetibilidad. <sup>[14]</sup>		
Normalmente LC forma parte del estudio para determinar el intervalo de trabajo. No deberá determinarse por extrapolación abajo de la concentración más baja del blanco fortificado. Si las mediciones se hacen bajo condiciones de repetibilidad se obtiene también una medida de la repetibilidad de la precisión, a esta concentración.		

**3.1.7.3 ¿CRITERIOS DE ACEPTACIÓN?** Para propósitos de validación el límite de cuantificación es un parámetro útil para declarar el valor de la concentración debajo de la cual el método analítico no puede operar con precisión aceptable.

Cuando se mida a nivel de trazas, es requisito determinarlo por curva de calibración a niveles cercanos al límite de detección. Para el caso de pruebas de impurezas el LC debe ser menor a la especificación del contenido / valoración.

**3.1.7.4 ¿DECISIONES A TOMAR?** Ni el LD ni el LC representan niveles a los que sea imposible la cuantificación sino que el valor de incertidumbre en esa zona se acerca al valor del resultado obtenido.

Cuando las regulaciones son estrictas se usan curvas patrón y análisis de regresión a bajas concentraciones para determinar los límites de cuantificación con valores de pendiente intercepción de la recta y desviación estándar de los residuales.<sup>[14]</sup>



### **3.1.8 RECUPERACIÓN (RECOBRO).**

**3.1.8.1 ¿QUÉ ES?** Es el cociente entre la cantidad de analito medido y el contenido real de analito en la muestra, expresado en porcentaje. En el caso ideal, se obtiene un 100%. En mediciones experimentales puede perderse analito especialmente en el caso de tratamientos complejos de muestras con analito en cantidades traza, dando lugar a porcentajes de recuperación menores (importante especialmente en el caso de procedimientos cromatográficos).

Los métodos analíticos no siempre miden todo el analito de interés presente en la muestra. Además los analitos pueden estar presentes en una variedad de formas en las muestras, no todas de interés para el analista. El método puede diseñarse así deliberadamente para determinar sólo una forma particular del analito. Sin embargo si no se determina todo el analito presente puede ser debido un problema inherente al método. De cualquier modo, es necesario evaluar el rendimiento del método detectando todo el analito presente.<sup>[6]</sup>

Debido a que normalmente no se conoce cuánto de un analito particular está presente en una porción de prueba es difícil estar seguro de cuan exitoso fue el método en extraerlo de la matriz. Una manera de determinar el rendimiento de la extracción es adicionar porciones de prueba (spike) con el analito a varias concentraciones, extraer entonces la porción de prueba fortificada y medir la concentración del analito. El problema inherente con esto es que el analito es introducido en forma tal que probablemente no se retendrán tan fuertemente como los que se encuentran naturalmente presentes en la matriz de la porción de prueba y así la técnica dará una impresión alta de recuperación en la extracción poco realista. Es sin embargo la manera más común de determinar la eficacia de la recuperación, y se reconoce como una manera aceptable de hacerlo. Aún así el inconveniente de la técnica debe tenerse presente. Alternativamente puede ser posible realizar estudios de recuperación en materiales de referencia, si están disponibles los materiales convenientes. Siempre que éstos se hayan producido por la caracterización de materiales naturales en vez de caracterización de materiales sintéticos en los que el analito se haya adicionado (spike), entonces el estudio de recuperación debe representar seguramente la extracción de porciones de prueba reales.<sup>[6]</sup>

### 3.1.8.2 ¿CÓMO SE DETERMINA/CALCULA?

Recuperaciones (recobros). Referencia rápida.<sup>[6]</sup>

Analizar	Repeticiones	¿Qué calcular de los datos?	Comentarios
Matriz blanco o muestras no fortificadas y fortificadas con el analito de interés en un intervalo de concentraciones.	6	Determinar la recuperación del analito a varias concentraciones:  $\text{Recuperación (\%)} = \frac{C1-C2}{C3} \times 100$ dónde C1= concentración determinada en muestra fortificada. C2= concentración determinada en muestra no-fortificada. C3= concentración de fortificación.	Las muestras fortificadas deben compararse con la misma muestra no fortificada para evaluar la recuperación neta de la fortificación. Las recuperaciones desde muestras fortificadas o matrices blanco usualmente son mejores que en muestras reales en las que el analito está más estrechamente unido.
Materiales de referencia Certificados (MRC).		Determinar la recuperación del analito con respecto al valor certificado	Depende de como fue producido y caracterizado el MRC, puede ser posible obtener >100% de recuperación.

Para calcular la recuperación se determina la función de recuperación. Para lo cual se agregan a la muestra antes del tratamiento cantidades sucesivas del analito y se determinan contra una calibración base. Las cantidades encontradas se representan gráficamente contra las cantidades reales agregadas para cada concentración y se caracteriza la recta obtenida según se indica en el anexo V-5.

**3.1.8.3 ¿CRITERIOS DE ACEPTACIÓN?** En el caso ideal los valores caen en la bisectriz (m=1, b=0) de la incertidumbre de los resultados. En este caso la recuperación es del 100% y es suficiente una calibración base, del analito en un disolvente.

**3.1.8.4 ¿DECISIONES A TOMAR?** Si los valores se salen de este marco, debe hacerse una calibración a partir de la matriz y del analito en un disolvente para eliminar el efecto de la matriz. Variando el tiempo de adición del analito (por ejemplo, antes y después de un paso de concentración) puede determinarse la recuperación para etapas aisladas de un procedimiento.

En caso de que la matriz introduzca muchas variaciones debe utilizarse en lugar de una calibración con la matriz de la muestra el método del agregado patrón (o de las adiciones estándar), el cual consiste en agregar concentraciones sucesivas de analito a la muestra. Al graficar el aumento de la señal contra la cantidad adicionada se obtiene una función de calibración, a partir de la cual puede obtenerse la cantidad de analito presente en la muestra original. Este método conduce a un aumento claro en la

concentración del analito. Para mantener el error lo más pequeño posible, las cantidades añadidas deben ser tales que no sobrepasen el intervalo de trabajo.<sup>[12]</sup>

### 3.1.9 ROBUSTEZ.

**3.1.9.1 ¿QUÉ ES?** El objetivo de la prueba de robustez también llamada prueba de **desigualdad** es optimizar el método analítico y describir que bajo las condiciones establecidas (incluidas sus tolerancias) se pueden obtener resultados suficientemente exactos con una alta seguridad, de manera que el procedimiento funcione confiablemente si se utiliza en otros laboratorios o después de intervalos largos de tiempo. Un método es más robusto entre menos dependan los resultados del ensayo de una modificación en las condiciones de éste. Al desarrollar un nuevo método analítico debe determinarse la modificación de los resultados por el cambio en las condiciones del ensayo. Las condiciones que afectan el método de medición son por ejemplo, para el caso de cromatografía:<sup>[12]</sup> el laboratorio (lugar de la medición), el personal, los reactivos (disolventes, estándares, etc.), los aparatos, el pH de la fase móvil (ej. en HPLC), el flujo de la fase móvil, el gradiente de temperatura (ej. en GC).

#### 3.1.9.2 ¿CÓMO SE DETERMINA/CALCULA?

Prueba de Robustez. Referencia rápida.<sup>[11]</sup>

Analizar	No de veces	Calcular	Comentarios
Identificar las variables que podrían tener un efecto significativo en el desempeño del método. Preparar experimentos (analizando materiales de referencia, muestras de composición conocida o materiales de referencia certificados) para controlar el efecto, en la exactitud y precisión, de cambiar sistemáticamente las variables.	Analizar una vez cada serie de condiciones experimentales.	Determinar el efecto de cada cambio de condición en la media. Ordenar de mayor a menor las variables de acuerdo a su efecto en el desempeño del método.	Diseñar el Control de Calidad para controlar las variables críticas. Concentrarse en estas variables para la mejora del método.

Para determinar la robustez de un procedimiento analítico pueden modificarse algunas condiciones del análisis y seguir las afectaciones a los resultados o a los parámetros estadísticos. A menudo se utiliza también la evaluación de espectros o cromatogramas. En cualquier método habrá ciertas etapas que, si no se realizan con suficiente cuidado, afectarán en forma severa el desempeño del método e incluso pueden hacer que no trabaje. Estas etapas deben ser identificadas, usualmente como parte del desarrollo del método, y si fuera posible, debe evaluarse su influencia en el desempeño del método usando la prueba de robustez. Esto involucra hacer variaciones deliberadas al método, e investigar el efecto subsiguiente en el desempeño. Entonces es posible identificar las

variables que tiene el efecto más significativo en el método y asegurar que se controlen estrechamente, al usar el método.

**3.1.9.3 ¿CRITERIOS DE ACEPTACIÓN?** Modificaciones pequeñas a las variables críticas deben afectar muy poco o nada al resultado del análisis. Una medida de un método analítico efectivo es que tan bien permanece o baja la validez de su desempeño al ponerlo en práctica.

**3.1.9.4 ¿DECISIONES A TOMAR?** Un aspecto importante de la robustez es la estabilidad de todas las muestras, estándares y reactivos, tanto en el almacenamiento como durante las condiciones de ensayo. En este caso pueden ser parámetros a probar:<sup>[12]</sup> sensibilidad a la temperatura, sensibilidad a la luz, descomposición química, hidrólisis. Ej. por la humedad del aire, facilidad de oxidación, efectos catalíticos, ej. por las paredes del contenedor, adsorción, ej. durante la filtración de disoluciones con trazas, precipitación, ej. al dejar mucho tiempo una disolución.

Donde haya necesidad de mejorar el método más allá, probablemente, mejoras adicionales pueden ser hechas concentrándose en esas partes del método conocidas como críticas. Usualmente se evalúa la robustez durante el desarrollo del método, típicamente por el laboratorio originador, antes de colaborar con otros laboratorios. Una técnica establecida para la prueba de robustez se describe en AOAC<sup>[4]</sup>. Normalmente se aplican las pruebas de robustez para investigar el efecto en, ya sea, la precisión o la exactitud.<sup>[6]</sup>

### **3.1.10 EXACTITUD, VERACIDAD, SESGO.**

**3.1.10.1 ¿QUÉ ES?** La **exactitud** normalmente se estudia como dos componentes: **veracidad** y **precisión**. La veracidad (de un método) es una expresión de que tan cerca está la media de una serie de resultados (producida por el método) del valor verdadero. La veracidad normalmente se expresa en términos de **sesgo** (a menor sesgo mayor veracidad). La precisión es una medida de cuán cerca están los resultados entre sí uno del otro y normalmente se expresa por medidas tales como desviación estándar la cual describe la dispersión de los resultados. Además, una expresión de exactitud cuyo uso común va en aumento es la medición de **incertidumbre** que proporciona una sola expresión de cifras de exactitud.<sup>[13]</sup>

La exactitud se verifica mediante el uso: de materiales de referencia apropiados<sup>[25]</sup>, de métodos de referencia y mediante la participación en programas de colaboración entre laboratorios.<sup>[13]</sup>

La valoración práctica de la veracidad depende de la comparación de resultados promedio de un método con valores conocidos, o sea, la veracidad se evalúa contra un valor de referencia (es decir el valor verdadero o el valor convencionalmente verdadero). Se dispone de dos técnicas básicas: verificar contra valores de referencia de un material caracterizado o con valores de otro método caracterizado. Los valores de referencia son idealmente trazables a patrones internacionales. Generalmente se acepta que los Materiales de Referencia Certificados (MRC) proporcionan valores trazables; el valor de referencia es entonces el valor certificado de dicho material. Notar que los valores de referencia, certificados o no, pueden ser absolutos (trazable al Sistema Internacional de Unidades) o convencionales, es decir, generalmente acordados para un propósito particular.<sup>[6]</sup>

### 3.1.10.2 ¿CÓMO SE DETERMINA/CALCULA? <sup>[24]</sup>

Exactitud y veracidad. Referencia rápida.<sup>[6]</sup>

Analizar	No de veces	Calcular	Comentarios
a) Un reactivo blanco y un material de referencia usando el método candidato.	10	El valor promedio del blanco sustraído del valor promedio del analito del material de referencia. Comparar con el valor verdadero o convencionalmente verdadero para el material de referencia. Da una medida del sesgo del método.	Sujeto a la incertidumbre de que el blanco sea un blanco verdadero, y a la caracterización del material de referencia.
b) Un reactivo blanco y un material de referencia/prueba usando el método candidato y un método independiente (preferentemente primario).	10	El valor promedio del blanco sustraído del valor promedio del analito para el material de referencia/ensayo. Comparar con mediciones similares hechas usando un método independiente / primario. Da una medida del sesgo del método en relación al método independiente/primario.	El método independiente puede tener sesgos por sí mismo por lo que no da una medida absoluta de exactitud. El método primario idealmente no tiene sesgo así que es la mejor medida de exactitud.

Para verificar la veracidad usando un material de referencia, se debe determinar la media, la desviación estándar de una serie de réplicas de pruebas, y se debe comparar con el valor caracterizado de un material de referencia. El material de referencia ideal es un material de referencia certificado de matriz, natural, muy similar a las muestras

de interés. Está claro que la disponibilidad de tales materiales es limitada. Los materiales de referencia para la validación pueden por consiguiente ser:

- materiales típicos preparados adicionados (spiking en inglés) con materiales de referencia certificados puros u otros materiales de pureza y estabilidad conveniente;
- materiales típicos bien-caracterizados, verificados internamente para estabilidad y retenidos para control de calidad interno.<sup>[6]</sup>

El sesgo de un método analítico, generalmente se determina<sup>[24]</sup> comparando la media experimental del análisis  $\bar{x}$  con el valor de referencia  $\mu$ ; mediante una gráfica para juzgar si esta diferencia es consecuencia de un error aleatorio en el análisis del material de referencia o de un sesgo en el método usado como se indica en el anexo V.

**3.1.10.3 ¿CRITERIOS DE ACEPTACIÓN?** Teóricamente si no hay errores sistemáticos la gráfica de los valores medios experimentales frente a las concentraciones conocidas de las muestras la pendiente de la recta obtenida debiera ser 1 y la ordenada al origen 0. En la realidad la línea obtenida experimentalmente debe estar dentro de intervalos de confianza calculados para m y b, ver anexo V. Si la línea obtenida experimentalmente está dentro de los márgenes correspondientes a la pendiente y a la ordenada en el origen el método se puede considerar validado. Si la diferencia experimental  $\bar{x} - \mu$  es mayor que la diferencia calculada con la ecuación

$\bar{x} - \mu = \pm \frac{ts}{\sqrt{n}}$  es posible que exista un sesgo, si es menor o igual no queda demostrada la presencia del sesgo. En ausencia de sesgo la media de un conjunto de datos se aproxima al valor verdadero.

**3.1.10.4 ¿DECISIONES A TOMAR?** Los errores sistemáticos causantes del sesgo son de tres tipos: errores instrumentales (se detectan y corrigen mediante calibración con patrones adecuados porque la respuesta de la mayoría de los instrumentos cambia con el tiempo como consecuencia del uso, corrosión o trato inadecuado, por ejemplo deriva o fugas), errores personales (pueden minimizarse poniendo cuidado y con autodisciplina, por ejemplo comprobando por duplicado las lecturas del instrumento) y errores del método (son mas difíciles de detectar y de corregir que los otros errores, se deben por ejemplo a reacciones incompletas, pérdidas por volatilidad, adsorción del analito sobre sólidos, inestabilidad de los reactivos, se detectan haciendo la validación del método con materiales de referencia que se parezcan a las muestras a analizar,

tanto en su estado físico como en su composición química. Este requisito de semejanza de matriz es fácil de cumplir para metales o minerales, pero es mucho más complicado en el caso de muestras ambientales (contaminación), alimentos, o biológicas. En estos últimos casos es frecuente recurrir a la liofilización y trituración de material, lo cual acarrea algunas pérdidas de las características originales de la matriz.

### **3.2 EVALUACIÓN Y COMPARACIONES DE RESULTADOS.**

El método sometido a validación escrito explícitamente y examinado para evitar cualquier ambigüedad en el texto; llevado a cabo por un analista experimentado que efectúa 4 ó 5 réplicas de cada muestra, repetidas en días diferentes siguiendo al pie de la letra el método escrito o haciendo las réplicas aquí descritas para cada parámetro en la sección correspondiente. El analista evaluará los errores y posibles desviaciones del método. Después llevará a cabo los cálculos y las comparaciones estadísticas de los resultados que permitan adoptar una decisión final.

Para este estudio estadístico, una vez que se dispone de una serie de datos generados por el método en cuestión, se calcula primero la media y la varianza para cada muestra a partir de las réplicas indicadas anteriormente. El número de dígitos mantenidos al determinar los valores debería ser el máximo permitido por la calculadora o la computadora, y no debería realizarse el **redondeo** hasta que se halla completado todo el cálculo.

Posteriormente se hacen las comparaciones pertinentes entre los resultados y los valores de referencia. La comparación de dos medias de muestra supone que dos muestras al azar provienen de poblaciones normales y pueden calcularse los límites de confianza de la verdadera diferencia, entre las medias de las dos poblaciones. **Muestra al azar** implica observaciones estadísticamente independientes, es decir las muestras no dependen, de ninguna forma, una de otra.

**3.2.1 COMPARACIÓN DE UN CONJUNTO DE RESULTADOS CON UN VALOR DE REFERENCIA.** Demuestra si un valor experimental es igual a un valor de referencia (una especificación o material de referencia) mediante una prueba de Hipótesis relativa a **una media** usando la t de student (ver anexo III).

Cuando se determina un analito de un material de referencia dado siguiendo la metodología que se desea validar se obtiene un conjunto de n mediciones repetitivas.

La media aritmética  $\bar{x}$  de estos resultados, en ausencia de errores sistemáticos, debería coincidir con el valor verdadero  $\mu$  asignado por el proveedor del material de referencia. En realidad y dado que los errores aleatorios, se compensan cuando el número de repeticiones es muy elevado, existe una diferencia entre  $\mu$  y  $\bar{x}$ . El problema se reduce a conocer si esta discrepancia es debida a la presencia de algún error sistemático o sólo a errores aleatorios. Cuando el número de repeticiones llevadas a cabo con el material de referencia es menor que 30 y si los resultados obtenidos siguen una distribución normal, se calcula el estadístico  $t_{\text{exp}}$  (ver anexo III) y se compara con el valor  $t_{\text{tab}}$ . Si  $|t_{\text{exp}}| < |t_{\text{tab}}|$  se acepta la hipótesis nula, es decir se acepta que no existen diferencias estadísticamente significativas entre  $\mu$  y  $\bar{x}$ . Y por tanto que no se han detectado errores sistemáticos al analizar el material de referencia con la metodología utilizada para el nivel de significancia elegido.<sup>[13]</sup>

### **3.2.2 COMPARACIÓN DE LAS VARIANZAS DE DOS CONJUNTOS DE DATOS.**

Demuestra si hay diferencia significativa entre las **varianzas de dos muestras** para posteriormente, dependiendo del resultado, comparar sus medias como se indica en 3.2.3 y 3.2.4.

Se calcula mediante la Prueba F de Fisher (ver anexo III) de tal forma que aquella de las dos varianzas  $s_1^2$  ó  $s_2^2$  que sea mayor se sitúa en el numerador. Esta relación calculada se compara con el valor tabulado para el nivel de significancia  $\alpha$  elegido y  $n_1-1$  y  $n_2-1$  grados de libertad correspondientes al numerador y denominador respectivamente (ver anexo III). Si  $F_{\text{exp}} > F_{\text{tab}}$  se concluye que hay una diferencia estadísticamente significativa entre las varianzas.

**3.2.3 COMPARACIÓN DE DOS CONJUNTOS DE RESULTADOS CON VARIANZAS SEMEJANTES.** Demuestra si dos resultados experimentales son iguales entre sí mediante una prueba de Hipótesis relativa a **dos medias con varianzas desconocidas y semejantes**, usando la t de student (ver anexo III).

Se comparan resultados del método candidato contra resultados o condiciones de un método de referencia. En muchas ocasiones es necesario comparar las medias aritméticas  $\bar{x}_1$  y  $\bar{x}_2$  de dos conjuntos de datos. Éste sería el caso cuando no existen materiales de referencia para la evaluación de un determinado método, y éste se



validará por comparación con los resultados obtenidos mediante un método independiente (primario), o cuando se quieren comparar los resultados proporcionados por dos condiciones distintas.

Si el número de resultados  $n_1$  ó  $n_2$  de los dos conjuntos de datos independientes es menor que 30, si cada uno de ellos sigue un distribución normal y si las varianzas  $s_1^2$  y  $s_2^2$  de cada conjunto **no difieren** de forma estadísticamente significativa se calcula el valor  $t_{exp}$  (ver anexo III). Si  $|t_{exp}| < |t_{tab}|$  se concluye que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las medias aritméticas obtenidas con los métodos para el nivel de significancia considerado.

**3.2.4 COMPARACIÓN DE DOS CONJUNTO DE RESULTADOS CON VARIANZAS DIFERENTES.** Demuestra si dos resultados experimentales son iguales entre sí mediante una prueba de Hipótesis relativa a **dos medias con varianzas desconocidas y diferentes**, usando la t de student (ver anexo III).

Se comparan resultados del método candidato contra resultados o condiciones de un método de referencia. Si el número de resultados  $n_1$  ó  $n_2$  de los dos conjuntos de datos independientes es menor que 30, si cada uno de ellos sigue un distribución normal y si las varianzas  $s_1^2$  y  $s_2^2$  de cada conjunto **difieren** de forma estadísticamente significativa se calcula el valor  $t_{exp}$  (ver anexo III). Si  $|t_{exp}| < |t_{tab}|$  se concluye que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las medias aritméticas obtenidas con los métodos para el nivel de significancia elegido y los grados de libertad resultantes de redondear al número entero más próximo el valor de:

$$\phi = \frac{\left( \frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2} \right)^2}{\frac{\left( \frac{s_1^2}{n_1} \right)^2}{n_1 - 1} + \frac{\left( \frac{s_2^2}{n_2} \right)^2}{n_2 - 1}}$$

Es importante distinguir entre la importancia estadística y la importancia práctica. La estadística simplemente significa que se rechaza la hipótesis nula. La habilidad de la prueba de descubrir diferencias que llevan al rechazo de la hipótesis nula depende del tamaño de la muestra. Por ejemplo, para una muestra particularmente grande, la prueba puede rechazar la hipótesis nula que dos medias del proceso sean equivalentes. Sin embargo, en la práctica la diferencia entre las dos medias puede ser

relativamente pequeña al punto de no ser de real importancia para el responsable de la toma de decisiones. De igual forma, si el tamaño de la muestra es pequeño, una diferencia que es grande para propósitos prácticos puede no llevar al rechazo de la hipótesis nula. El analista no sólo debe, ciegamente aplicar las pruebas, sino que debe combinar, tanto el juicio de la aplicación práctica como el del análisis estadístico.

#### **4.- CONCLUSIONES**

La realización y obtención de los parámetros y las comparaciones mencionados anteriormente permitirán validar diferentes metodologías, pero como parte de la conclusión a este trabajo escrito y por considerarlo también de importancia haremos una reflexión sobre la información que se debe proporcionar: un informe de validación que junto con el protocolo de validación son los documentos soporte de dicha validación.

##### **4.1 Puntos generales.**

- La identidad del analito, incluso especificidad cuando aplique (por ejemplo, “el arsénico total”);
- el intervalo de la concentración cubierto por la validación (por ejemplo, “0–50 ppm”);
- una especificación del intervalo de matrices del material de prueba cubierta por la validación (por ejemplo, “mariscos”);
- un protocolo, describiendo el equipo, los reactivos, el procedimiento, incluyendo la variación permisible en, las instrucciones especificadas (por ejemplo el calor a  $100 \pm 5^\circ\text{C}$  por  $30 \pm 5\text{min}$ ), los procedimientos de calibración y de calidad, y cualquier precaución de seguridad especial requerida;
- la aplicación que se intenta y sus requisitos de incertidumbre críticos (por ejemplo, El análisis de alimentos para propósitos de investigación. La incertidumbre estándar  $u(c)$  del resultado  $c$  debe ser menor a  $0.1 c$ )<sup>[7]</sup>.

##### **4.2 Organización y reporte de datos.**<sup>[26]</sup>

1. Anotar los **datos** en tablas con títulos y encabezados que las describan.
2. Cada variable numérica debe contener sus **unidades**.<sup>[27]</sup> (Usar mg/L ó mg/kg en vez de ppm; o para concentraciones porcentuales usar % (m/m), %(v/v) %(m/v) según sea el caso).

relativamente pequeña al punto de no ser de real importancia para el responsable de la toma de decisiones. De igual forma, si el tamaño de la muestra es pequeño, una diferencia que es grande para propósitos prácticos puede no llevar al rechazo de la hipótesis nula. El analista no sólo debe, ciegamente aplicar las pruebas, sino que debe combinar, tanto el juicio de la aplicación práctica como el del análisis estadístico.

#### **4.- CONCLUSIONES**

La realización y obtención de los parámetros y las comparaciones mencionados anteriormente permitirán validar diferentes metodologías, pero como parte de la conclusión a este trabajo escrito y por considerarlo también de importancia haremos una reflexión sobre la información que se debe proporcionar: un informe de validación que junto con el protocolo de validación son los documentos soporte de dicha validación.

##### **4.1 Puntos generales.**

- La identidad del analito, incluso especificidad cuando aplique (por ejemplo, “el arsénico total”);
- el intervalo de la concentración cubierto por la validación (por ejemplo, “0–50 ppm”);
- una especificación del intervalo de matrices del material de prueba cubierta por la validación (por ejemplo, “mariscos”);
- un protocolo, describiendo el equipo, los reactivos, el procedimiento, incluyendo la variación permisible en, las instrucciones especificadas (por ejemplo el calor a  $100 \pm 5^\circ\text{C}$  por  $30 \pm 5\text{min}$ ), los procedimientos de calibración y de calidad, y cualquier precaución de seguridad especial requerida;
- la aplicación que se intenta y sus requisitos de incertidumbre críticos (por ejemplo, El análisis de alimentos para propósitos de investigación. La incertidumbre estándar  $u(c)$  del resultado  $c$  debe ser menor a  $0.1 c$ )<sup>[7]</sup>.

##### **4.2 Organización y reporte de datos.**<sup>[26]</sup>

1. Anotar los **datos** en tablas con títulos y encabezados que las describan.
2. Cada variable numérica debe contener sus **unidades**.<sup>[27]</sup> (Usar mg/L ó mg/kg en vez de ppm; o para concentraciones porcentuales usar % (m/m), %(v/v) %(m/v) según sea el caso).

3. Las anotaciones numéricas del **cero** deben escribirse explícitamente, un **guión** indicará datos que faltan o no se han observado.<sup>[27]</sup>
4. Las anotaciones numéricas no debe comenzar con “punto”. El **signo decimal**, debe ser precedido por un cero y debe ser una coma sobre la línea.<sup>[27]</sup>
5. Los Números con varios **dígitos**, deben separarse en **grupos** preferentemente de tres, contando del signo decimal a la derecha y a la izquierda, los grupos deben ser separados por un pequeño espacio, nunca con una coma, un punto, o por otro medio.<sup>[27]</sup>
6. Los números que indican valores de una misma característica se han de dar con el mismo **número de cifras decimales**.
7. Revisar los datos, identificación de **datos discrepantes (aberrantes) o dudosos**, toma de decisión al respecto.

Los resultados **discrepantes** se han definido como aquellos que no pertenecen a una población o que existe una probabilidad inferior a un determinado valor para que pertenezcan a ella. Normalmente se producen al cometer equivocaciones o fallos en la metodología aplicada. Es por esta razón que han de buscarse concienzudamente las causas que generan un resultado de este tipo antes de que pueda ser descartado.<sup>[13]</sup>

#### **4.3 Pruebas de hipótesis.**

Dependiendo de los requisitos o criterios de aceptación y de la información experimental hacer las **pruebas de hipótesis** (ver anexo III) correspondientes que implica los siguientes pasos:

1. **Datos y suposiciones.**
2. **Formular hipótesis** acerca del parámetro o parámetros de acuerdo con el problema que se tiene (**Hipótesis nula  $H_0$  e Hipótesis alternativa  $H_a$** ).
3. **Escoger** un nivel de significación o riesgo  $\alpha$ .
4. **Escoger** el **estadígrafo** de prueba cuya distribución muestral es conocida en el supuesto de que  $H_0$  sea cierta.
5. Determinar la **región crítica**, misma que depende del tipo de hipótesis, del nivel de significación y del estadígrafo de prueba.
6. **Calcular** el **estadígrafo de prueba** para los valores de la muestra al azar, de modo que puedan ser comparados con los valores críticos (teóricos, encontrados en tablas estadísticas).

7. Decidir la **aceptación o rechazo** de  $H_0$  y dar una **conclusión** al problema planteado.

#### **4.4 Evaluación de los resultados de validación.**

A lo largo del estudio de validación el número de repeticiones de las mediciones que se han propuesto es pequeño, pero de tamaño suficiente para que sean representativas. Los criterios de aceptación deben fijarse previamente por las entidades reguladoras o el cliente y con ellos se comparan los resultados obtenidos y mediante pruebas de hipótesis e intervalos de confianza se decide acerca de la validez del método. Al final de un procedimiento de validación debe tomarse una decisión sobre la aptitud para la aplicación del método. De esta manera se confrontan los parámetros del método obtenidos, o bien las medidas de validación con lo establecido, en forma de informe final. Puede ocurrir que uno de los puntos del informe no concuerde con lo establecido en la instrucción de trabajo correspondiente a ese método de ensayo (por ejemplo repetibilidad del 7% en vez del 5% exigido) y que de todas maneras, se considere el método adecuado. Esto debe ser fundamentado en el ámbito de la validación por el responsable del ensayo. También puede detectarse la presencia de interferencias o un comportamiento proporcional de la precisión contra la concentración, la presencia de sesgo. Todo ello debe documentarse y en su caso corregirse a fin de obtener resultados de medición de gran confiabilidad.

El proceso de validación, descrito hasta ahora en este trabajo propone, elaborar un protocolo de validación, evaluar sistemáticamente los parámetros considerados necesarios, comparar estadísticamente los resultados contra valores de referencia documentando todo en un informe de validación incluyendo decisiones acerca del método analítico empleado por los laboratorios con sus capacidades y limitaciones. Al tener sus métodos analíticos validados internamente, el laboratorio podrá, además de comprobar que domina el ensayo y lo utiliza correctamente, establecer un Sistema de Medición Analítico que le permita, entre otras cosas comparar dichos métodos con otros, estar preparado para participar en estudios comparativos con otros laboratorios para determinar la aptitud de su personal, o cuando aplique en el desarrollo o evaluación de materiales de referencia.

## 5.- BIBLIOGRAFÍA

- [1] NMX-EC-17025-IMNC-2000 (ISO/IEC 17025:1999) "Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración".
- [2] SE-CENAM-EMA "Guía Técnica Sobre Trazabilidad e Incertidumbre en las mediciones analíticas que emplean las técnicas de Espectrofotometría de Ultravioleta - Visible" 2004-06-28. Vista en [www.ema.org.mx](http://www.ema.org.mx) (2005-09-07).
- [3] SE-CENAM-EMA "Guía técnica sobre trazabilidad e incertidumbre en las mediciones analíticas que emplean las técnicas de cromatografía de gases (CG) y cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR)" Mayo 2004. Vista en [www.ema.org.mx](http://www.ema.org.mx) (2005-09-07).
- [4] CENAM, "Guía sobre la calificación de equipo de instrumentos analíticos", 2004. Vista en [www.cenam.mx](http://www.cenam.mx) (2005-09-07).
- [5] AOAC "Official Methods of Analysis" (1990), pp 673-684.
- [6] EURACHEM "Guide The fitness for Purpose of Analytical Methods A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics", 1998] Published by LGC UK Vista en [www.eurachem.org/](http://www.eurachem.org/) (2005-09-07).
- [7] M. THOMPSON et al., "Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis.(IUPAC Technical Report)". *Pure and Applied Chemistry* 74, 835–855, (2002). Vista en [www.iupac.org/publications/pac/](http://www.iupac.org/publications/pac/) (2005-09-07).
- [8] EURACHEM GUIDE "Selection, use and interpretation of proficiency testing (PT) schemes by laboratories" 1ªed 2000 vista en [www.eurachem.org/](http://www.eurachem.org/) (2005-09-07).
- [9] EURACHEM/CITAC Guide "Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement" 2000, 2ªed. (QUAM-2000.1). Vista en [www.eurachem.org/](http://www.eurachem.org/) (2005-09-07).
- [10] EURACHEM/CITAC Guide "Traceability in Chemical Measurement. A guide to achieving comparable results in chemical measurement". 2003 Vista en [www.eurachem.org/](http://www.eurachem.org/) (2005-09-07).
- [11] SKOOG, D.A., HOLLER, F.J., NIEMAN TA. "Principios de Análisis Instrumental", Madrid McGraw-Hill, 2001.
- [12] OAA-DC-LE-05 "Guía para validación de métodos de ensayo" Organismo Argentino de Acreditación: 2003 Vista en [www.eurachem.org/](http://www.eurachem.org/) (2005-09-07).
- [13] VALCARCEL M, RÍOS A, "La calidad en los laboratorios Analíticos" Barcelona Reverté, 1992.

- [14] COLEGIO NACIONAL DE QUÍMICOS FARMACEÚTICOS BIÓLOGOS, MÉXICO A.C. "Guía de validación de Métodos Analíticos". 2002.
- [15] ANSI/ASTM E 275-67. "Describing and measuring performance of spectrophotometers" (Reapproved 1977).
- [16] ANSI/ASTM E 137-68 "Evaluation of mass spectrometers for chemical Analysis" (Reapproved 1975).
- [17] ANSI/ASTM E 663-78. "Flame Atomic Absorption Analysis".
- [18] FDA (CDER) Reviewer Guidance "Validation of Chromatographic Methods" Nov.94 (CMC 3) Vista en [www.fda.gov/cder](http://www.fda.gov/cder) sección "Regulatory Guidance". (2005-09-07).
- [19] EURACHEM/CITAC "Guide to Quality in Analytical Chemistry", 2002 Vista en [www.eurachem.org/](http://www.eurachem.org/) (2005-09-07).
- [20] APHA, AWWA, WPCF, "Métodos normalizados para el análisis de aguas potables y residuales" 17 ed. Madrid Díaz de Santos, 1992, pp I-61.
- [21] K. DANZER AND L. A. CURRIE. "Guidelines for Calibration in Analytical Chemistry (IUPAC Recommendations 1998)", *Pure Appl.Chem.* **70**, 993 (1998). Vista en [www.iupac.org/publications/pac/](http://www.iupac.org/publications/pac/) (2005-09-07).
- [22] ISO 8466-1990 Part 1: "WATER QUALITY-Calibration and evaluation of analytical procedures and the estimation of performance characteristics"
- [23] CENAM, "Buenas Prácticas de Laboratorio en Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución", febrero 1998.
- [24] ISO 5725 1994 "Accuracy (trueness and precision of measurement methods and results".
- [25] EEE/RM/062: "The selection and use of reference materials; A basic guide for laboratories and accreditation bodies" (2002). Vista en [www.eurachem.org/](http://www.eurachem.org/) (2005-09-07).
- [26] MÁRQUES DE CANTÚ M J. "Probabilidad y estadística para ciencias químico-biológicas". México McGraw-Hill, 1991.
- [27] NOM-008-SCFI 2002 "Sistema General de Unidades de Medida".
- [28] ENGINEERING STATISTICS HANDBOOK. Vista en [www.itl.nist.gov/div898/handbook/](http://www.itl.nist.gov/div898/handbook/) (2005-09-07).

**[29]** NMX-Z-055:1996 IMNC "*Metrología–Vocabulario de términos fundamentales y generales*", equivalente al documento International Vocabulary of Basic and General Terms in Metrology, BIPM, IEC, IFCC, ISO, IUPAC, IUPAP, OIML, 1993.

**[30]** ISO *International Vocabulary of Basic and General Terms in Metrology (VIM) 3rd Edition Draft April 2004.*

**[31]** CNM MRD PT004 "*Acreditamiento para laboratorios de química-Guía para la interpretación de la serie de normas EN45000 y la Guía ISO/IEC 25 CENAM*" 1993.



# **ANEXOS**

# ANEXO I

## TÉCNICAS ANALÍTICAS INSTRUMENTALES

TABLA 1. Clasificación de métodos analíticos.<sup>(11)</sup>

Métodos analíticos clásicos (Métodos de química húmeda)	Métodos analíticos instrumentales
Métodos en los cuales el material de medición no permite medir una señal de ruido (buretas, etc..).	Métodos en los cuales el instrumento de medición de la respuesta analítica permite medir una señal de ruido (cromatógrafo, espectrofotómetros, etc.).
Separación por: precipitación, extracción, destilación, etc.	Separación por: técnicas cromatográficas, electroforéticas, etc.
Identificación de productos por: color, punto de ebullición o de fusión, olor, su actividad óptica o su índice de refracción, etc.	Identificación y cuantificación del analito por: medidas de sus propiedades físicas y químicas como solubilidad en una serie de disolventes, su conductividad, potencial del electrodo, absorción o emisión de luz, relación masa/carga, fluorescencia, etc.
Cuantificación del analito por: medidas gravimétricas o volumétricas.	

TABLA 2. Propiedades químicas y físicas empleadas en métodos instrumentales.<sup>(11)</sup>

PROPIEDADES	MÉTODOS INSTRUMENTALES
radiación, emisión de la	espectroscopia de emisión (rayos X, UV, visible, de electrones, auger); fluorescencia, fosforescencia y luminiscencia (rayos X, UV, visible)
radiación, absorción de la	espectrofotometrías y fotometría (rayos X, UV, visible, IR) ; espectroscopia foto acústica; resonancia magnética nuclear y espectroscopia de resonancia de espín electrónico
radiación, dispersión de la	turbidimetría; nefelómetro, espectroscopia Raman
radiación, refracción de la	refractometría; interferometría
radiación, difracción de la	métodos de difracción de rayos X y de electrones
radiación, rotación de la	polarimetrías; dispersión rotatoria óptica, dicroísmo circular
eléctrico, potencial	potenciometría, cronopotenciometría
eléctrica, carga	culombimetría
eléctrica, corriente	polarografía; amperometría
eléctrica, resistencia	conductimetría
masa	gravimetría (microbalanza de cristal de cuarzo)
razón masa a carga	espectrometría de masas
velocidad de reacción	métodos cinéticos
propiedades térmicas	gravimetría y volumetría térmica; calorimetría de barrido diferencial; análisis térmico diferencial; métodos de conductividad térmica
radiactividad	métodos de activación y de dilución isotópica

Tabla 3. Ejemplos de componentes de los instrumentos.<sup>[11]</sup>

Instrumento	Fuente de Energía (estímulo)	Señal Analítica	Transductor de Entrada	Dominio de los datos de la información transformada	Procesador de Señal	Lectura
Fotómetro	Lámpara de Wolframio, filtro de vidrio	Haz de luz atenuado	Fotocélula	Corriente eléctrica	Escala de medida	Medidor de corriente
Espectrómetro de Absorción/ Emisión Atómica	Llama	Radiación UV o visible	Tubo foto multiplicador	Potencial eléctrico	Amplificador, desmodulador, monocromador, cortador	Registrador sobre papel
Culombímetro	Fuente de corriente continua	Corriente de la celda	Electrodos	Corriente eléctrica	Amplificador	Registrador sobre papel
pHmetro	Muestra, electrodo de vidrio	Actividad del ión hidrogeno	Electrodo de vidrio y de calomel	Potencial eléctrico	Amplificador, digitalizador	Unidad digital
Difractómetro de rayos X para polvos	Tubo de Rayos X; muestra	Radiación difractada	Película fonográfica	Imagen latente	Revelador químico	Imágenes ennegrecidas en una película
Comparador de color	Luz solar	Color	Ojo humano	Señal del nervio óptico	Cerebro humano	Respuesta visual al color

# ANEXO II

## VALIDACIÓN Y DESEMPEÑO

TABLA 1. Elementos de requisitos analíticos y parámetros de desempeño relacionados.<sup>(6)</sup>

Elementos de requisitos analíticos	Parámetros de desempeño relacionados	
Clase de respuesta requerida. ¿Cualitativa o Cuantitativa?	Confirmación de identidad, selectividad/especificidad, límite de detección, límite de cuantificación	
¿El analito esta disperso o localizado?		a)
¿Está el analito presente en mas de una forma?, ¿Interesa el analito, extraíble, Libre o total?	Confirmación de identidad, recobro	
¿Cuales son los analitos de interés y a que niveles se presenta N (% , µg/g ng/g, etc.)?	Confirmación de identidad, límite de detección, límite de cuantificación, intervalo de linealidad y de trabajo	
¿Cuan exacta (bias) y precisa (r y r) debe ser la respuesta? Que grado de incertidumbre es permitido y como se expresa?	Recobro, exactitud/veracidad, precisión repetibilidad/ precisión reproducibilidad	b)
¿Cual es la naturaleza física o química de la matriz?		a)
¿Cuales son interferencias probables del analito?	Selectividad/especificidad	
¿Se requiere muestreo y submuestreo (y esto se hará dentro del laboratorio)?		a)
¿Alguna restricciones respecto al tamaño o disponibilidad de la muestra?		a)
¿Recursos restringidos, hay disponibilidad de gente, tiempo, dinero, equipo y reactivos de laboratorio?		a)
¿Los resultados necesitan ser comparados con los resultados de otros laboratorios?	Robustez/desigualdad reproducibilidad	
¿Los resultados necesitan ser comparados con especificaciones externas?	Exactitud y reproducibilidad	

a) No todos los elementos de los requerimientos analíticos se relacionan directamente con los requisitos de aprobación del método. Algunos de ellos generalmente solo dictaminarán si las técnicas particulares son aplicables. Por ejemplo, se aplicarían diferentes técnicas según si el analito se dispersa a través de la muestra o si se aísla en la superficie.

b) Un elemento esencial del requisito analítico es que debe ser posible dictaminar si un método es conveniente o no para su intención de propósito.

**TABLA 2. Objetivos y alcance de la validación según el tipo de procedimiento de ensayo.**<sup>[12]</sup>

Método de ensayo	Objetivos de la validación	Parámetros de desempeño recomendados
Caso 1 Método Normalizado (se aplica exactamente como está descrito en la Norma).	Comprobación de que el laboratorio domina el ensayo y lo utiliza correctamente	1. Comprobación del cumplimiento de los parámetros indicados en la norma (Ej.: repetibilidad, exactitud, límite de detección, incertidumbre). 2. elaboración de una carta de control analizando un material de referencia. 3. participación en ensayos interlaboratorios.
Caso 2 Modificación de un Método Normalizado.	Comprobación de que la repetibilidad, la reproducibilidad, la precisión intermedia, y la exactitud del método original no dependen de la modificación introducida y que el laboratorio domina el ensayo y lo utiliza correctamente.	4. Además de lo indicado para el Caso 1 de esta Tabla, probar los siguientes parámetros: Intervalo de trabajo / linealidad, Tipo de ajuste, Recuperación, Robustez, Especificidad, Estabilidad, Reproducibilidad.
Caso 3 Método interno (método de ensayo elaborado en el laboratorio y que no se encuentra en Normas u otras colecciones de métodos).	Comprobación de que el método tiene la repetibilidad, la reproducibilidad, la precisión intermedia y la exactitud suficientes para el objetivo de aplicación y que el laboratorio domina el ensayo y lo realiza correctamente.	Además de lo indicado para el Caso 1 de esta Tabla, probar todos los parámetros de desempeño posibles.

**TABLA 3. Principales parámetros de validación de los métodos.**<sup>[2,3]</sup>

Situación	Grado de validación ó Revalidación requerida
Desarrollo de un método para un problema en particular.	Completo
Existe un método evaluado para aplicarlo en un problema en particular.	Completo
Un método establecido, realizar una revisión para incorporar innovaciones.	Parcial o completo
Un método establecido, extenderlo o adaptarlo a un problema nuevo	Parcial o completo
Cuando el control de calidad indica que un método establecido cambia con el tiempo.	Parcial o completo
Establecer un método en un laboratorio diferente.	Parcial
Establecer un método con diferente instrumentación.	Parcial
Establecer un método con diferente operador.	Parcial

# ANEXO III

## CONSIDERACIONES ESTADÍSTICAS

Parámetros y estadígrafos. <sup>[26,28]</sup>

Un valor que describe en forma global a la población se llama **parámetro** mientras que un valor que describe en forma global a una muestra se llama **estadígrafo, estadístico o estimador**. Generalmente los parámetros se representan con letras griegas y los estadígrafos con letras latinas así la media de la población es  $\mu$  y la media aritmética de la muestra es  $\bar{X}$ . Para distinguir la desviación estándar de una población, de la desviación estándar de una muestra obtenida de la población, se emplean los símbolos  $\sigma$  y  $s$  respectivamente.

Cuando los parámetros de la población tales como  $\mu$  ó  $\sigma$  se desconocen pueden estimarse mediante sus correspondientes estadísticos muestrales, si es que las muestras son suficientemente grandes.

Dos importantes características de los datos cuantitativos son sus **medidas de tendencia central** y sus **medidas de variabilidad o de dispersión**.

### III-1. Medidas de tendencia central (también llamada promedio).

Es el valor central o típico, pues es el más representativo, del conjunto de datos. Hay muchos promedios, cada uno de los cuales posee propiedades particulares, las más frecuentemente trabajadas son:

Tabla 1

Parámetro /estadígrafo	Cálculo o definición	Ventajas	Desventajas
Media (media aritmética) $\mu \quad \bar{X}$	$\hat{\mu} = \bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$	1) Refleja cada valor, 2) propiedades algebraicas. 3) es la más usada en análisis estadístico.	1) Puede ser excesivamente influenciada por valores extremos.
Mediana <b>Md</b>	Md 50% de los valores son mayores y 50% son menores que ella	1) Menos sensible a valores extremos que la media.	1) Difícil de calcular si hay muchos datos, 2) no tiene propiedades algebraicas.
Moda <b>M</b>	Valor con la frecuencia más alta	1) Fácil de calcular, 2) valor "típico", más valores reunidos en este punto que en cualquier otro.	1) No se presta para el análisis estadístico, 2) puede haber más de una moda o ninguna.

Otros menos usados son el centro de amplitud, la media armónica, la media geométrica y la media aritmética ponderal.

### III-2. Medidas de dispersión (variabilidad).

Además de la tendencia de los valores a agruparse en las cercanías de un valor promedio, es necesario saber cuanto se dispersan o varían, es decir que tan cerca o lejos están uno de otro; las más usadas son:

Tabla 2

Parámetro /estadígrafo	Cálculo o definición	Ventajas y desventajas
Intervalo R	Valor máximo-valor mínimo	No se obtiene una idea clara de la dispersión, pues varias distribuciones diferentes pueden tener el mismo valor de amplitud.
Desviación media D.M	$D.M. = \frac{\sum  x_i - \bar{x} }{n}$	No tiene signo.
Varianza $\sigma^2$ $s^2$	$\hat{\sigma}^2 = s^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}$	No tiene signo, unidades físicas al cuadrado de los datos.
Desviación estándar (desviación típica) $\sigma$ o $s$	$s = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n-1}} = \frac{\sqrt{n \sum x^2 - (\sum \bar{x})^2}}{n(n-1)}$	Mismas unidades físicas que la de los datos. Es la más usada en análisis estadísticos.
Coefficiente de variación CV	$V = 100 * \frac{s}{\bar{x}}$	Exenta de unidades, se expresa en porcentaje. Se usa para comparar distribuciones con diferentes unidades o para comparar las dispersiones de dos distribuciones diferentes. Cuando la media se acerca a cero deja de ser útil.
Variable normalizada z	$z = \frac{(x - \bar{x})}{\sigma/n}$	Mide la desviación de la media en unidades de desviación estándar (es decir es independiente de las unidades usadas) Es de gran valor en la comparación de distribuciones.
t de student	$t = \frac{(\bar{x} - \mu)}{\frac{s}{\sqrt{n}}}$	Permite comparar un resultado experimental contra un valor de referencia, Permite comparar dos resultados experimentales entre sí.
chi cuadrado $\chi^2$	$\chi^2 = \frac{n \cdot s^2}{\sigma^2}$	Permite comparar la dispersión experimental contra una especificación o criterio.
F de Fisher	$F_{exp} = \frac{s_M^2}{s_n^2}$	Compara la dispersión experimental de dos muestras entre sí.

Una interpretación de la desviación estándar es que si la distribución es aproximadamente normal, el intervalo es:

- a)  $x \pm s$ , contiene aproximadamente 68% de las observaciones.
- b)  $x \pm 2s$ , contiene aproximadamente 95% de las observaciones.
- c)  $x \pm 3s$ , contiene aproximadamente casi todas las observaciones (99,7%).

A veces la desviación estándar de una muestra viene definida con (n-1) en lugar de n en el denominador porque el valor resultante representa un mejor estimador de la desviación estándar de una población de la que se ha tomado la muestra. Para valores de  $n > 30$  son prácticamente iguales las dos definiciones.

### III-3. Distribución muestral.

Para cada una de todas las posibles muestras de tamaño  $n$  que puedan extraerse de una población dada, se puede calcular un estadígrafo, tal como, la media, la desviación estándar, etc., que variará de una muestra a otra. De esta forma se obtiene una distribución del estadígrafo que se conoce, a partir de muestras del mismo tamaño. Cuando la media muestral es este estadígrafo, la distribución se conoce como la **distribución muestral de medias**.

Para poblaciones infinitas o para muestreo con reemplazamiento:

Media de la distribución muestral de medias  $\mu_x = \mu$

Desviación estándar de la distribución muestral de medias  $\sigma_x = \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$

A la desviación estándar de la distribución muestral de un estadígrafo se le denomina **error estándar**.

Si el tamaño de muestra  $n$  es bastante grande, las distribuciones muestrales son normales o casi normales. Cuando  $n < 30$  las muestras se llaman pequeñas. En el caso de que la población se distribuya normalmente, la distribución muestral de medias se distribuye también normalmente, incluso para muestras pequeñas.

#### III-3.1 Distribución normal.

De todas las distribuciones continuas la distribución normal o Gaussiana es el modelo de mayor uso, no solo sirve como distribución modelo de muchos problemas prácticos de la vida real sino que también es utilizada en muchas investigaciones teóricas

La **distribución normal estándar** es aquella cuya media es cero y cuya desviación estándar es 1, se usa la variable normal estándar o variable normalizada  $z$  para distinguirla de los demás tipos de distribuciones.

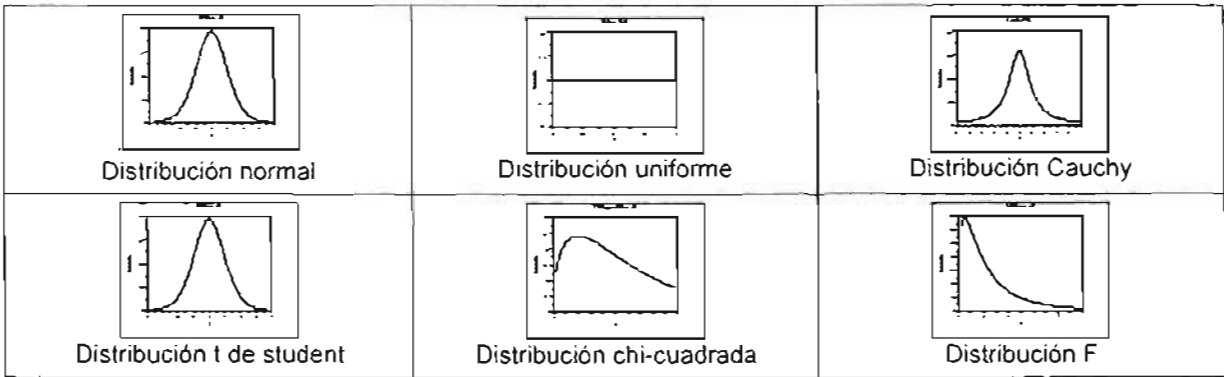
La distribución normal es la distribución continua más importante por las siguientes razones:

- 1.- Muchas variables aleatorias que aparecen con relación a experimentos u observaciones prácticas están distribuidas normalmente.
- 2.- Otras variables están distribuidas normalmente en forma aproximada.
- 3.- Algunas veces una variable no está distribuida normalmente, ni siquiera en forma aproximada, pero se puede convertir en una variable con distribución normal por medio de una distribución sencilla.
- 4.- Ciertas distribuciones se pueden aproximar mediante la distribución normal (como en el caso de las distribuciones binomial y de Poisson).
- 5.- En estadística teórica muchos problemas pueden ser resueltos fácilmente en el supuesto de una población normal.

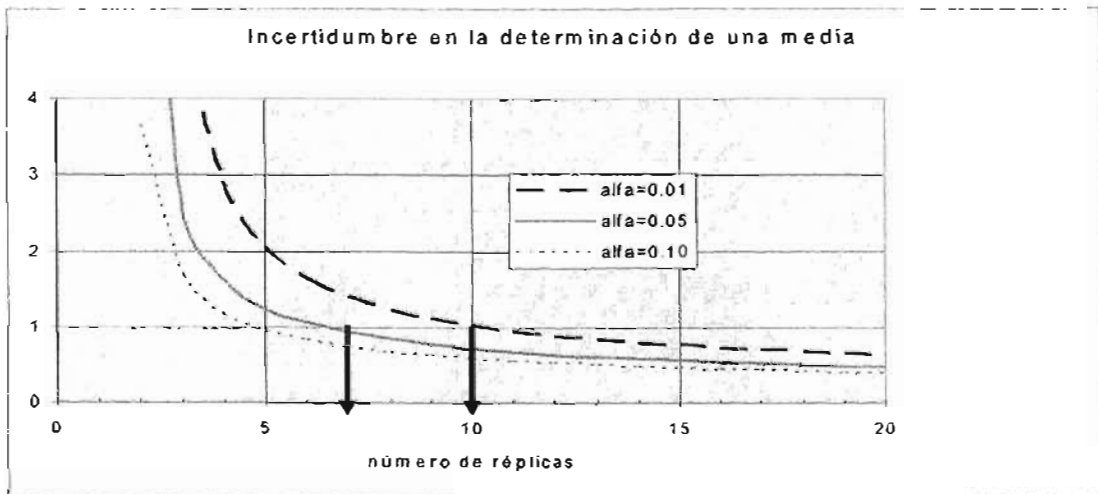
#### III-3.2 Otras distribuciones muestrales.<sup>[28]</sup>

La medición química es un proceso generalmente costoso algunas veces requiere de mucho tiempo, por lo cual el tamaño de muestras (réplicas) es generalmente pequeño, no es aplicable el modelo de distribución normal ( $z$ ), se utiliza el modelo de distribución de  $t$  de student ó el de distribución  $\chi^2$  para muestras pequeñas. Al aumentar el número de replicas se reduce la incertidumbre.





En la siguiente figura se ve que para tener un buen estimador de una medición experimental se necesitarían por lo menos siete réplicas con un riesgo promedio del 5% o diez réplicas en el caso de que no se puedan correr grandes riesgos (1%). En cualquier caso, más de veinte réplicas ya no representan incrementos notables de calidad y si mayor trabajo. En la práctica es común el uso de triplicados e incluso solamente duplicados, por lo que las incertidumbres son generalmente altas.



#### III-4. Estadística inferencial o paramétrica.

Se infiere información sobre una población mediante muestras extraídas de ella; se hace una estimación de los parámetros de la población a partir de los estadísticos muestrales y se toman decisiones estadísticas acerca de las hipótesis establecidas sobre la población, en base a lo que conoce de las muestras. La estima de un parámetro poblacional dada por un número se llama estima de punto del parámetro  $\hat{\theta}$ . La estima de un parámetro poblacional dada por dos números entre los cuales se considera que se encuentra dicho parámetro  $\hat{\theta}$ , con cierto grado de confiabilidad, se llama estima de intervalo de confianza, y se representa de manera general como:

$$P(\hat{\theta} - k\sigma_{\hat{\theta}} < \theta < \hat{\theta} + k\sigma_{\hat{\theta}}) = 1 - \alpha \text{ ó } \hat{\theta} \pm k s / \sqrt{n-1}$$

dónde k es un valor crítico (z, t,  $\chi^2$ ) que se obtiene de tablas o se calcula en Excel a un coeficiente o nivel de confianza (1- $\alpha$ ) y a ciertos grados de libertad.  $\alpha$  es el nivel de significación (significancia) que representa la probabilidad que el intervalo no incluya el parámetro.

Tabla 3

K	Cálculo experimental	Cálculo de valor crítico (Excel)
z	$z = \frac{(x - \bar{x})}{\sigma/n}$	VALORES EN TABLAS
t	$t = \frac{(x - \mu)}{s/\sqrt{n}}$	DISTR.T.INV( $\alpha$ , $\varphi$ ) para hipótesis alterna de mayor o menor ó DISTR.T.INV( $2\alpha$ , $\varphi$ ) para hipótesis alterna de desigualdad
$\chi^2$	$\chi^2 = \frac{nS^2}{\sigma^2}$	VALORES EN TABLAS
F	$F_{exp} = \frac{S_M^2}{S_m^2}$	DISTR.F.INV( $\alpha$ , $\varphi$ ) para hipótesis alterna de mayor o menor ó DISTR.F.INV( $\alpha/2$ , $\varphi$ ) para hipótesis alterna de desigualdad

### III.4.1 Inferencia estadística (pruebas de hipótesis).<sup>(28)</sup>

Es común en estadística estimar un parámetro desde una muestra de datos. El valor del parámetro que usa todos los posibles datos, no sólo los datos de la muestra, se llama **parámetro poblacional**. El **valor verdadero del parámetro** es una estimación del verdadero valor del parámetro se hace usando los datos de la muestra. Esto se llama una **estimación de punto** o una estimación de la muestra. Por ejemplo, la medida más comúnmente usada de tendencia central es la media, el valor verdadero de la población, la media, es la suma de todos los miembros de la población dada dividida entre el número de miembros en la población. Como es típicamente impráctico medir cada miembro de la población, una muestra al azar es tomada de esta población. La media de la muestra es calculada sumando los valores en la muestra y dividiendo entre el número de valores en la muestra. Esta media de la muestra se usa entonces como la estimación de punto de la media poblacional. Las **estimaciones del intervalo** extienden las estimaciones de punto incorporando la incertidumbre de la estimación de punto. En el ejemplo para la media, diferentes muestras provenientes de la misma población generarán valores diferentes para la media de la muestra. Una estimación del intervalo cuantifica esta incertidumbre en la estimación de la muestra calculando los valores superior e inferior de un intervalo el cual, a un nivel dado de confianza (es decir, probabilidad), contendrá el parámetro poblacional.

### III-4.2 Las pruebas de hipótesis.

También trabajan con la incertidumbre de la estimación de la muestra. Sin embargo, en lugar de proporcionar un intervalo, una prueba de hipótesis intenta refutar una demanda específica acerca de un parámetro de la población basado en los datos de la muestra. Por ejemplo, la hipótesis podría ser uno de lo siguiente:

- la media poblacional es igual a 10,
- la desviación estándar población es igual a 5,
- las medias de dos poblaciones son iguales,
- las desviaciones normales de 5 poblaciones son iguales.

Rechazar una hipótesis es concluir que es falsa. Sin embargo, aceptar una hipótesis no significa que es verdad, sólo que no se tiene evidencia para creer otra cosa. Así comúnmente las pruebas de hipótesis se proponen en ambos términos, una condición de la que se duda (la hipótesis nula) y una condición que se cree (la hipótesis alternativa). La hipótesis nula es la igualdad entre las variables comparadas y la alterna puede ser que son diferentes o que una es mayor que la otra. Estas últimas dos posibilidades hacen que las pruebas de hipótesis puedan realizarse bilateralmente, a dos colas (variables diferentes) o unilateralmente, a una cola de las distribuciones (una variable mayor que la otra).

En la tabla 4 se resumen algunas de las pruebas de hipótesis y estimaciones por intervalos de confianza.

En la tabla 5 siguiente se muestra un formato común para una prueba de hipótesis con un ejemplo resaltado en gris.

Tabla 4. Pruebas de hipótesis y estimaciones por intervalos de confianza.<sup>[26]</sup>

Hipótesis a contrastar	Supuestos	Estadígrafo de contraste /	Intervalo de confianza
$H_0: \mu = \mu_0$ Hipótesis relativas a una media	$\sigma$ conocida muestras grandes	$z = \frac{\bar{X} - \mu_0}{\sigma / \sqrt{n}}$	$\bar{x} - Z_{1-\alpha/2} \frac{\sigma}{\sqrt{n}} < \mu < \bar{x} + Z_{1-\alpha/2} \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$
$H_0: \mu = \mu_0$ Hipótesis relativas a una media	$\sigma$ desconocido a muestras pequeñas	$t_{exp} = \frac{\bar{x} - \mu_0}{s / \sqrt{n}}$ <p style="text-align: center;">grados de libertad = <math>n - 1</math></p>	$\bar{x} - t_{1-\alpha/2} \frac{s}{\sqrt{n}} < \mu < \bar{x} + t_{1-\alpha/2} \frac{s}{\sqrt{n}}$
$H_0: \mu_1 = \mu_2$ Hipótesis relativas a dos medias con varianzas semejantes	Muestras independientes $\sigma_1^2 = \sigma_2^2$ desconocidas e iguales	$t_{exp} = \frac{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2)}{\sqrt{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}} \sqrt{\frac{n_1 n_2 (n_1 + n_2 - 2)}{n_1 + n_2}}$ <p style="text-align: center;">grados de libertad = <math>n_1 + n_2 - 2</math></p>	$\bar{x}_1 - \bar{x}_2 - t_{1-\alpha/2} S_p \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}} < \mu_1 - \mu_2 < \bar{x}_1 - \bar{x}_2 + t_{1-\alpha/2} S_p \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}$ <p>Donde <math>S_p = \frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}{n_1 + n_2 - 2}</math></p>
$H_0: \mu_1 = \mu_2$ Hipótesis relativas a dos medias con varianzas diferentes	Muestras independientes $\sigma_1^2 \neq \sigma_2^2$ desconocidas y diferentes	$t_{exp} = \frac{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2)}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}}$ $\phi = \frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}\right)^2}{\left(\frac{s_1^2}{n_1}\right)^2 + \left(\frac{s_2^2}{n_2}\right)^2}$ <p style="text-align: center;">grados de libertad = <math>\phi</math></p>	$\bar{x}_1 - \bar{x}_2 - t_{1-\alpha/2} \sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}} < \mu_1 - \mu_2 < \bar{x}_1 - \bar{x}_2 + t_{1-\alpha/2} \sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}$
$H_0: \sigma^2 = \sigma_0^2$ Hipótesis relativas a una varianza	-----	$\chi_{exp}^2 = \frac{(n-1)s^2}{\sigma_0^2}$ <p style="text-align: center;">grados de libertad = <math>n-1</math></p>	$\frac{(n-1)s^2}{\chi_{1-\alpha/2}^2} < \sigma^2 < \frac{(n-1)s^2}{\chi_{\alpha/2}^2}$
$H_0: \sigma^2 = \sigma_0^2$ Hipótesis relativas a dos varianzas	-----	$F_{exp} = \frac{S_M^2}{S_m^2}$ <p style="text-align: center;">grados de libertad = <math>n_2 - 1</math> y <math>n_1 - 1</math></p>	$\frac{S_M^2}{S_m^2 F_{1-\alpha/2, V_1, V_2}} < \frac{\sigma_M^2}{\sigma_m^2} < \frac{S_M^2}{S_m^2 F_{\alpha/2, V_1, V_2}}$

Tabla 5 Formato común para una prueba de hipótesis.

Ejemplo para comparar resultado de una muestra contra una especificación o valor de referencia

Hipótesis nula a contrastar  $H_0$ : una declaración de la hipótesis nula, por ejemplo, dos medias poblacionales son iguales.  $H_0: \mu = \mu_0$

Hipótesis alterna  $H_a$ : una declaración de la hipótesis alterna, por ejemplo, dos medias poblacionales no son iguales:  $\mu \neq \mu_0$

El estadígrafo de la prueba dependiendo de la hipótesis específica por ejemplo:

Estadígrafo de prueba (Estadígrafo de contraste):

$$t_{\text{exp}} = \frac{\bar{x} - \mu_0}{s / \sqrt{n}}$$

Grados de libertad:

n-1

$\alpha$  (normalmente es de 5%, aunque también se usa 2% ó 1%).

Nivel de significación o significancia:

El nivel de significación o significancia  $\alpha$  (define la sensibilidad de la prueba). Un valor de  $\alpha = 0.05$  significa que se rechaza la hipótesis nula inadvertidamente 5% del tiempo cuando en realidad es verdadera. Esto también se llama error tipo I. La elección de  $\alpha$  es algo arbitrario, aunque en la práctica, comúnmente se usan valores de 0.1, 0.05, y 0.01.

La probabilidad de rechazar la hipótesis nula cuando en realidad es falsa se llama el poder de la prueba y se denota por  $1 - \beta$ . Su complemento, la probabilidad de aceptar la hipótesis nula cuando la hipótesis alternativa es, en realidad verdadero (el tipo II error), se llama  $\beta$  y sólo puede computarse para una hipótesis alternativa específica.

Región crítica o región de rechazo e intervalo de confianza:

La región crítica abarca aquellos valores del estadígrafo de contraste que conducen a un rechazo de la hipótesis nula. Se basa en la distribución del estadígrafo de contraste a un nivel de significación, dado.

Es la región que contiene los resultados menos favorables a  $H_0$  en el supuesto que  $H_0$  sea verdadera, los valores críticos del estadígrafo de prueba al nivel de significación dado delimitan ésta región de la región de aceptación (la que contiene los resultados mas favorables a  $H_0$ ). Por ejemplo  $\mu = \bar{x} \pm t_{\alpha/2}^* \frac{s}{\sqrt{n}}$

Rechazar si: Ej: elegir una opción

$$t_{\text{exp}} < -t_{\alpha}$$

$$t_{\text{exp}} > t_{\alpha}$$

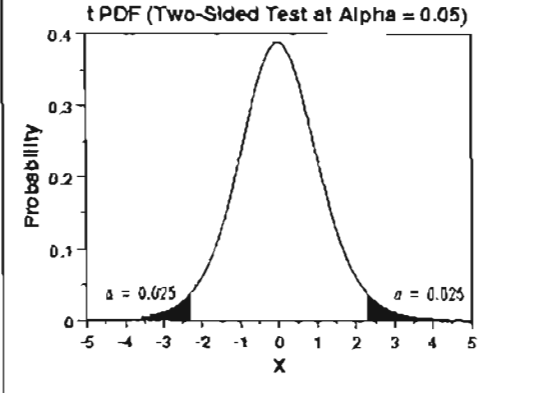
$$\text{Por Ejemplo } t_{\text{exp}} < -t_{\alpha/2} \text{ ó } t_{\text{exp}} > t_{\alpha/2}$$

Observaciones:

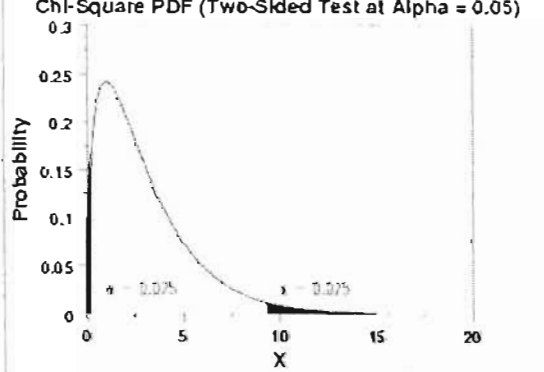
$\sigma$  es desconocida  $\mu_0$  es el valor de la variable de referencia contra la que se compara la media experimental  $\bar{x}$  y  $s$  es el estimador experimental de la desviación estándar.

### III-4.3 Determinación de valores críticos para los estadígrafos (t, $\chi^2$ y F).

III-4.3.1 Obtención de valores críticos para distribución "t de student"<sup>[28]</sup>: Debido a la simetría de la distribución t, se usa la misma tabla tanto para ensayos a una cola (una variable mayor que otra) como para ensayos a 2 colas (variables diferentes) usando el valor apropiado de  $\alpha$ .

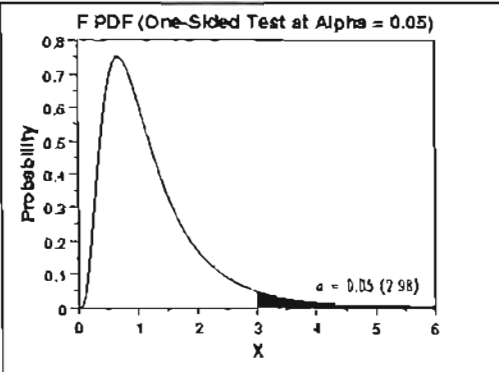
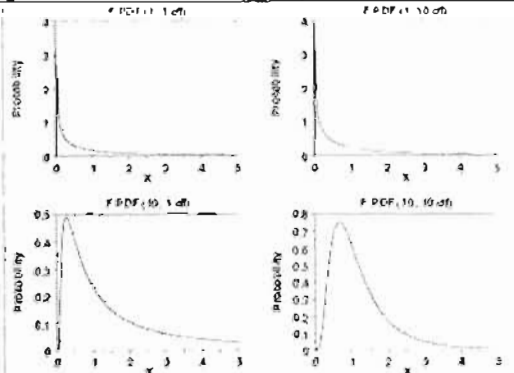
	<p>En esta gráfica se muestra, el nivel de significación o riesgo <math>\alpha</math> con una distribución t y 10 grados de libertad. El nivel de significación o riesgo <math>\alpha</math> normalmente usado es 0.05. Para un ensayo a 2 colas <math>\alpha</math> se calcula a <math>\alpha/2</math> (0.025).</p> <p>Para ensayos a dos colas, el valor crítico se encuentra en tablas bajo la columna que corresponde a <math>\alpha/2</math>. La hipótesis nula se rechaza si el valor absoluto experimental del estadígrafo es mayor que el valor del obtenido de tablas t <math>\alpha/2</math>.</p>
<p>Para ensayos a la cola <u>superior</u>, el valor crítico se encuentra en tablas bajo la columna que corresponde a <math>\alpha</math>. La hipótesis nula se rechaza, si el valor absoluto experimental del estadígrafo es <u>mayor</u> que el valor obtenido de tablas t<math>_{\alpha}</math></p>	<p>Para ensayos a la cola <u>inferior</u>, el valor crítico se encuentra en tablas bajo la columna que corresponde a <math>\alpha</math>. La hipótesis nula se rechaza, si el valor absoluto experimental del estadígrafo es <u>menor</u> que el valor negativo obtenido de tablas t<math>_{\alpha}</math></p>

III-4.3.2 Obtención de valores críticos para distribución chi cuadrada ( $\chi^2$ )<sup>[28]</sup>: Debido a la falta de simetría de la distribución chi-cuadrada, existe una tabla para las distribución de la cola superior y otra tabla para la cola inferior, el estadígrafo  $\chi^2$  se calcula de los datos con  $\nu$  grados de libertad.

	<p>En esta gráfica se muestra, el nivel de significación o riesgo <math>\alpha</math> con una distribución- <math>\chi^2</math> y 3 grados de libertad. El nivel de significación o riesgo <math>\alpha</math> normalmente usado es 0.05.</p> <p>Para un ensayo a 2 colas el valor crítico se encuentra en la <u>tabla de valores críticos superiores</u>, bajo la columna que corresponde a <math>\alpha/2</math>. Rechazar la hipótesis nula si el estadígrafo experimental es <u>mayor</u> que el de la tabla. o de manera similar encontrar el valor crítico en la <u>tabla de valores críticos inferiores</u>, bajo la columna <math>1- \alpha/2</math>. Rechazar la hipótesis nula si el estadígrafo experimental es <u>menor</u> que el valor obtenido de la tabla.</p>
<p>Para ensayos a la cola <u>superior</u>, encontrar el valor crítico bajo la columna que corresponde a <math>\alpha</math> en la <u>tabla de valores críticos superiores</u>. Rechazar la hipótesis nula si el valor absoluto del estadígrafo experimental es <u>mayor</u> que el valor obtenido de tablas</p>	<p>Para ensayos a la cola <u>inferior</u>, encontrar el valor crítico bajo la columna que corresponde a <math>1-\alpha</math> en la <u>tabla de valores críticos inferiores</u> Rechazar la hipótesis nula si el valor absoluto experimental del estadígrafo es <u>menor</u> que el valor obtenido de tablas.</p>

III-4.3.3 Obtención de valores críticos para distribución F<sup>[28]</sup>: La distribución F es el cociente de dos distribuciones chi cuadrada con grado de libertad  $\nu_1$  y  $\nu_2$ , respectivamente donde cada chi cuadrada ha

sido primero dividida por sus grados de libertad. La distribución F se usa en muchos casos para las regiones críticas en hipótesis de prueba y para determinar intervalos de confianza.

	<p>El gráfico muestra una distribución de F con <math>v_1 = 10</math> y <math>v_2 = 10</math>. El área sombreada del gráfico indica la región de rechazo al nivel de significación <math>\alpha</math>. Se calcula un estadígrafo experimental con <math>v_1</math> y <math>v_2</math> grados de libertad, y el resultado se compara a la tabla.</p> <p>Una prueba a dos colas requiere un serie de tablas que contengan las regiones de rechazo tanto para la cola inferior como la cola superior como la inferior.</p>
<p>Cuando es una prueba a una cola se tiene la probabilidad en la cola superior de exceder el valor crítico y se pone cero en la cola inferior porque la distribución de F es asimétrica.</p>	<p>La tabla que contiene los valores críticos superiores de la distribución de F se usa para las pruebas de F a una cola con nivel de significancia <math>\alpha = 0.05, 0.10, \text{ y } 0.01</math>.</p>
<p>En las siguientes gráficas se ve la forma de la función de densidad de Probabilidad F para 4 diferentes valores de parámetros.</p>	

# ANEXO IV

## GLOSARIO

### IV-1 CONDICIONES ÓPTIMAS DE TRABAJO

**IV-1.1 Condiciones de referencia:** Condiciones de uso prescritas para las pruebas de funcionamiento de un instrumento de medición o para la Intercomparación de resultados de mediciones.<sup>[29]</sup>

**NOTA:** Las condiciones de referencia comprenden, generalmente, valores de referencia o intervalos de referencia para las magnitudes de influencia que afectan el instrumento de medición.

**IV-1.2 Condición óptima para un Sistema de medición / condición óptima:** la condición de uso para un sistema de medición bajo la cual su contribución a la incertidumbre de medición es mínima.<sup>[30]</sup>

**IV-1.3 Adecuabilidad:** verificación de que el sistema (instrumento, analista, sustancia de referencia, entre otros) opera con base a criterios preestablecidos, que permitan asegurar la confiabilidad de los resultados de un método analítico.<sup>[14]</sup>

**IV-1.4 Calificación de equipos e instrumentos de medición analítica (CEIMA):** Proceso general que asegura que un instrumento es apropiado para el uso propuesto y que su desempeño está de acuerdo a las especificaciones establecidas por el usuario y el proveedor. La CEIMA se compone de los siguientes procesos, la Calificación de Diseño (CD), Calificación de Instalación (CI), Calificación de Operación (CO) y Calificación de Desempeño (C de D).<sup>[4]</sup>

- ▲ **Calificación del diseño (CD):** Cubre todos los procedimientos previos a la instalación del sistema en el ambiente seleccionado. La CD define las especificaciones operacionales y funcionales del instrumento y detalla las decisiones deliberadas en la selección del proveedor.<sup>[4]</sup>
- ▲ **Calificación de instalación (CI):** Cubre todos los procedimientos relacionados a la instalación del instrumento en el ambiente seleccionado. La CI establece que el instrumento se recibió como se diseñó y se especificó, que este instrumento fue adecuadamente instalado en el ambiente seleccionado, y que este ambiente es apropiado para la operación y uso del instrumento.<sup>[4]</sup>
- ▲ **Calificación de operación (CO):** Es el proceso en donde se demuestra que un instrumento funcionará de acuerdo a su especificación operacional en el ambiente seleccionado.<sup>[4]</sup>
- ▲ **Calificación de desempeño (C de D):** Es definida como el proceso en donde se demuestra que un instrumento se desempeña consistentemente de acuerdo a una especificación apropiada para su uso rutinario.<sup>[4]</sup>

**IV-1.5 Confirmación metrológica:** Conjunto de operaciones requeridas para asegurarse de que el equipo de medición es conforme a los requisitos correspondientes a su uso previsto.

#### **NOTAS:**

1.-La confirmación metrológica generalmente incluye la calibración y verificación, cualquier ajuste o reparación necesario, y la subsiguiente recalibración, la comparación con los requisitos metrológicos del uso previsto del equipo, así como cualquier sellado y etiquetado requerido.

2.-La confirmación metrológica no se logra hasta que se haya demostrado y documentado la adecuación del equipo de medición para el uso previsto.



3.-Los requisitos para el uso previsto incluyen consideraciones tales como alcance, resolución y error máximo permitido.

4.-Los requisitos metroológicos normalmente difieren de los requisitos para el producto y no están especificados en éstos.

**CRITERIO:** El proceso de confirmación metroológica se debe aplicar solo a los instrumentos que se utilizan en mediciones físicas tales como balanzas analíticas, termómetros, manómetros, hidrómetros, picnómetros, sonómetros, luxómetros, cronómetros y flujómetros, entre otros.

## IV-2 CONFIRMACIÓN DE IDENTIDAD O SELECTIVIDAD/ESPECIFICIDAD

**IV-2.1 Selectividad (o especificidad):** La capacidad de un método para determinar exacta y específicamente al analito de interés en la presencia de otros componentes en la matriz bajo condiciones de prueba establecidos.<sup>[2,3]</sup>

**IV-2.2 Selectividad:** Coeficiente que indica el grado de ausencia de interferencias con otras especies que contiene la matriz de la muestra.<sup>[11]</sup>

**IV-2.3 Especificidad del sistema:** Capacidad de un método analítico para obtener una respuesta debida únicamente al analito de interés y no a otros componentes de la muestra.<sup>[14]</sup>

## IV-3. INTERVALO DE TRABAJO Y LINEALIDAD

**IV-3.1 Intervalo de trabajo (medición):** La serie de valores de mensurandos para los cuales el error de un instrumento de medición se intenta que caiga dentro de límites especificados.<sup>[6]</sup>

**IV-3.2 Intervalo de trabajo:** El ámbito de trabajo de un método analítico, es el intervalo entre los niveles más bajo y más alto de concentraciones en que se ha demostrado que puede ser determinado el analito con la precisión y la exactitud requeridas en una determinada matriz.<sup>[12]</sup>

**IV-3.3 intervalo:** Concentraciones incluidas dentro de la concentración superior e inferior del analito (incluyendo éstas) para las cuales se ha demostrado que el método analítico es preciso exacto y lineal.<sup>[14]</sup>

**IV-3.4 Intervalo de trabajo:** En análisis cuantitativo, el intervalo de trabajo es obtenido a través de la medición de muestras con diferente concentración del analito, y seleccionando el intervalo de concentración que proporciona un nivel de incertidumbre aceptable.<sup>[2, 3, 6, 11, 19]</sup>

### NOTAS:

1.-Dentro del intervalo de trabajo puede existir un intervalo de respuesta lineal. Dentro de éste intervalo lineal de respuesta habrá una relación lineal con la concentración del analito.

2.-El intervalo de trabajo es generalmente más amplio que el intervalo lineal el cual puede establecerse durante la evaluación del intervalo de trabajo.

3.-El intervalo de trabajo se refiere al intervalo de valores de concentración en las disoluciones que se miden realmente y no a la concentración en la muestra original.

**IV-3.5 Linealidad:** Define la habilidad del método para obtener resultados proporcionales a la concentración del analito en la prueba.<sup>[2, 3, 6]</sup>

**NOTA:** Se infiere que el intervalo lineal "es el intervalo de concentraciones del analito sobre las cuales el método proporciona resultados de pruebas proporcionales a la concentración del analito"

**IV-3.6 Linealidad:** Habilidad para asegurar que los resultados obtenidos directamente o por medio de la transformación matemática definida, son proporcionales a la concentración del analito, dentro de un intervalo determinado.<sup>[14]</sup>

**IV-3.7 Intervalo lineal:** Va desde la concentración más pequeña (LC) a la que se puede trabajar en medidas cuantitativas hasta la concentración en que la curva de calibración se desvía de la linealidad límite (LOL).<sup>[14]</sup>

**IV-3.8 Calibración:** Conjunto de operaciones que establecen, en condiciones especificadas, la relación entre los valores de las magnitudes indicadas por un instrumento de medición o un sistema de medición, o los valores representados por una medida materializada o un material de referencia, y los valores correspondientes de la magnitud realizada por los patrones.<sup>[2,3,29]</sup>

**NOTAS:**

1.-El resultado de una calibración permite atribuir a las indicaciones los valores correspondientes del mensurando, o determinar las correcciones para aplicarlas a las indicaciones.

2.-Una calibración también puede servir para determinar otras propiedades metroológicas tales como los efectos de magnitudes de influencia.

3.-El resultado de una calibración puede ser consignado en un documento algunas veces llamado certificado de calibración o informe de calibración.

4.-Debido a que la calibración de instrumentos de mediciones físicas no incluyen operaciones de ajuste, el laboratorio debe tener establecidos criterios de aceptación y rechazo documentados para saber si los instrumentos están dentro de las características metroológicas originales y que son adecuadas para cumplir con los requisitos metroológicos del uso propuesto. En el caso de mediciones químicas lo anterior no aplica, ya que la mayoría de los instrumentos de medición química requieren una optimización de la señal de respuesta y esto se logra efectuando diferentes ajustes, dígase posición del nebulizador, flujos de gas, alineación de lámparas, temperatura de flama, selección de eluyentes, etc., siguiendo las recomendaciones correspondientes a cada técnica de acuerdo al manual del instrumento.

**CRITERIO:** El término calibración se utilizará en dos aplicaciones diferentes. En lo que respecta a la calibración en las mediciones físicas, la calibración de los instrumentos de medición deberá ser realizada por Laboratorios de Calibración Acreditados. En lo que respecta a la calibración en las mediciones analíticas, la realizarán los Laboratorios de Ensayo empleando Materiales de Referencia Certificados.

En las mediciones químicas se establece la trazabilidad a cantidad de sustancia a través de la curva de calibración, en la cual se establece la relación entre la señal del instrumento de medición y la concentración del mensurando por medio de los Materiales de los Referencia Certificados. Respecto a la calibración del material volumétrico, termómetros u otros instrumentos de medición (manómetros, higrómetros, etc.), se deberá exigir su calibración, realizado por Laboratorios de Calibración Acreditados, sólo si su influencia en la incertidumbre de la medición es significativa, lo cual deberá demostrarse documentalmente. En estos casos, el laboratorio debe tener evidencias de la verificación periódica de la calibración de sus instrumentos o materiales, de acuerdo a su uso.

Los casos en los que no se requiere la calibración de material volumétrico, termómetros u otros instrumentos, por no ser ésta significativa en la incertidumbre de la medición, aún así, el laboratorio deberá mostrar evidencias de la verificación, según las especificaciones del fabricante, antes de su uso y periódicamente, de acuerdo a su uso.

#### IV-4 PRECISIÓN (REPETIBILIDAD Y REPRODUCIBILIDAD)

**IV-4.1 Precisión Intermedia de Medición, Precisión Intralaboratorio:** Medición de la precisión bajo condiciones de precisión intermedia, las cuales incluyen el mismo *procedimiento* de medición, el mismo *lugar*, y réplicas de las mediciones durante un *amplio* periodo de tiempo. Se permiten cambios dentro de un tipo dado de *calibración*, de *observador*, y de *instrumento*, se deben especificar y documentar las condiciones cambiadas y no cambiadas durante la realización práctica de la medición.<sup>[6,12,14,24,30]</sup>

**IV-4.2 Repetibilidad (de resultados de mediciones):** Precisión bajo condiciones de repetibilidad. Proximidad de concordancia entre resultados de las mediciones sucesivas del mismo *mensurando*, con las mediciones realizadas con la aplicación de la totalidad de las siguientes condiciones llamadas condiciones de repetibilidad; el mismo *procedimiento* de medición; el mismo observador; el mismo *instrumento* de medición utilizado en las mismas *condiciones*; en el mismo *lugar* y con repeticiones dentro de un *corto* periodo de tiempo.<sup>[2,3,6,9,14,19,29]</sup>

**IV-4.3 Limite de repetibilidad “r”:** Valor al cual la diferencia absoluta entre dos resultados de ensayos obtenidos, bajo condiciones de repetibilidad puede esperarse que sea menor o igual, con una probabilidad del 95%. El límite de repetibilidad está dado por la fórmula:  $r = t_{\alpha} \cdot \sqrt{2} \sigma_r$ , donde  $t_{\alpha}$  es la t de student a dos colas para  $v = \infty$  a un nivel de confianza dado (normalmente 95% donde el valor es 1.96) y  $\sigma_r$  es la desviación estándar determinada bajo condiciones de repetibilidad. Esto le permite al analista decidir si es significativa la diferencia entre los análisis duplicados de una muestra  $|x_1 - x_2| \leq r$ , determinados bajo condiciones de **repetibilidad**.<sup>[6,24]</sup>

**IV-4.4 Reproducibilidad (de resultados de mediciones):** Precisión bajo condiciones de reproducibilidad. Proximidad de la concordancia entre los resultados de las mediciones del *mismo mensurando*, con las mediciones realizadas haciendo variar las condiciones de medición. Para que una expresión de la reproducibilidad sea válida, es necesario especificar las condiciones que se hacen variar. Pudiendo ser: el *principio* de medición; el método de medición; el *observador*, el *instrumento* de medición; el *patrón de calibración*; el *lugar*, las *condiciones* de uso; los periodos de *tiempo*.<sup>[2,3,6,9,14,19,24]</sup>

**IV-4.5 Limite de Reproducibilidad “R”:** Valor al cual la diferencia absoluta entre dos resultados de ensayos obtenidos bajo condiciones de reproducibilidad puede esperarse que sea menor o igual, con una probabilidad del 95%. El limite de reproducibilidad está dado por la fórmula:  $R = t_{\alpha} \cdot \sqrt{2} \sigma_R$  donde  $t_{\alpha}$  es la t de student a dos colas para  $v = \infty$  a un nivel de confianza dado (normalmente 95% donde el valor es 1.96) y  $\sigma_R$  es la desviación estándar determinada bajo condiciones de reproducibilidad. Esto le permite al analista decidir si es significativa la diferencia entre los análisis duplicados de una muestra  $|x_1 - x_2| \leq R$ , determinados bajo condiciones de **reproducibilidad**.<sup>[6,24]</sup>

#### IV-5 SENSIBILIDAD

**IV-5.1 Sensibilidad:** El cambio en la respuesta de un instrumento de medición dividido por el correspondiente cambio del estímulo (señal de entrada).<sup>[2,3,5]</sup>

**NOTA:** El estímulo puede ser por ejemplo: la cantidad del mensurando presente. La sensibilidad puede depender del valor de estímulo. Aunque esta definición se aplica claramente al instrumento de medición,

también puede aplicarse al método analítico en conjunto, tomando en cuenta otros factores como el efecto de los pasos para una concentración.

**IV-5.2 Sensibilidad:** Es la diferencia en la concentración del analito correspondiente a la diferencia mas pequeña en la respuesta del método que puede ser detectada.<sup>[31]</sup>

#### **IV-6 LÍMITE DE DETECCIÓN**

**IV-6.1 Limite de detección:** La menor concentración del analito en una muestra que puede detectarse, pero no necesariamente cuantificarse bajo las condiciones establecidas de la prueba.<sup>[11,29]</sup>

**IV-6.2 Límite de detección:** Mínima concentración o la mínima masa del analito que se puede detectar para un nivel de confianza dado.<sup>[11]</sup>

**IV-6.3 Limite de detección:** concentración mínima del analito, en una muestra, que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada bajo las condiciones de operación establecidas.<sup>[14]</sup>

**IV-6.4 Concentración neta detectable mínima:** La verdadera concentración neta o cantidad de analito en el material a ser analizado que con probabilidad  $(1-\beta)$ , llevará a la conclusión de que la concentración del analito en el material analizado es más grande que la de la blanco en la matriz.<sup>[6]</sup>

**IV-6.5 Límite de determinación / Límite de decisión:** La cantidad más baja posible de analito, realmente presente que se detectará y se identificará.<sup>[6]</sup>

#### **IV-7 LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN**

**IV-7.1 Limite de cuantificación:** Es la concentración más baja del analito que puede determinarse con un nivel de incertidumbre aceptable.

*NOTA: Debe establecerse empleando materiales de referencia o muestras apropiadas. Este límite, generalmente es el punto más bajo de la curva de calibración (excluyendo el blanco). No debe ser determinado extrapolando la curva de calibración del blanco:*

$$x_L = x_{bl} + k s_{bl}$$

*dónde  $x_{bl}$  es la media de las mediciones del blanco y  $s_{bl}$  la desviación estándar de las mediciones del blanco, y  $k$  es un factor numérico elegido de acuerdo al nivel de confianza deseado, siendo  $k = 5, 6$  ó  $10$ .<sup>[11]</sup>*

**IV-7.2 Limite de cuantificación:** Concentración mínima del analito, que puede ser determinado con precisión y exactitud apreciables bajo las condiciones de operación establecidas.<sup>[14]</sup>

**IV-7.3 Límite de cuantificación:** Es la menor cantidad que puede ser determinada cuantitativamente con una incertidumbre asociada para un nivel de confianza dado. Para el análisis cuantitativo debe quedar absolutamente claro que sólo se emplean valores atribuibles al analito. El límite de cuantificación está entre 3 y 10 veces el LD según cada caso.<sup>[12]</sup>

#### **IV-8 RECUPERACIÓN/RECOBRO**

**IV-8.1 Recuperación (Recobro):** Proporción de la cantidad de analito, presente en la porción de la muestra o adicionado a esta, que es cuantificada por el método de ensayo.<sup>[2,3]</sup>

*CRITERIO: normalmente se utiliza para evaluar la recuperación en porcentaje (% de recuperación) del analito presente o agregado a una muestra de control de calidad, evalúa la eficiencia de extracción, proceso de preparación o interferencias que pueden existir al aplicar el método de ensayo.*

#### **IV-9 ROBUSTEZ**

**IV-9.1 Robustez:** La robustez de un procedimiento analítico, es una medida de su capacidad de permanecer inalterado por pequeñas, pero deliberadas, variaciones en los parámetros del método y proporciona una indicación de su confiabilidad durante su uso normal.<sup>[2,3]</sup>

#### **IV-10 EXACTITUD/VERACIDAD/SESGO**

**IV-10.1.1 Exactitud de medición:** Proximidad de la concordancia entre el resultado de una medición y un valor verdadero del mensurando.<sup>[30]</sup>

##### **NOTAS:**

- 1.-El concepto de "exactitud" es cualitativo.
- 2.-El término "precisión" no debe utilizarse por "exactitud".

**IV-10.1.2 Exactitud de medición, exactitud:** concordancia entre el valor de la magnitud, obtenido en la medición y el valor verdadero del mensurando.<sup>[29]</sup>

##### **NOTAS:**

- 1.-La exactitud no puede expresarse como un valor numérico.
- 2.-La exactitud se relaciona inversamente al error sistemático y al error aleatorio.
- 3.-El término "exactitud de la medición" no debe usarse para la "veracidad de la medición" y el término "precisión de la medición" no debe usarse para "exactitud de la medición".

**IV-10.2 Veracidad de medición / Veracidad:** Concordancia entre el promedio que sucedería de un número infinito de valores de magnitud obtenido bajo condiciones de medición específicas y el valor verdadero del mensurando.<sup>[30]</sup>

##### **NOTAS:**

- 1.-La Veracidad no puede expresarse como un valor numérico.
2. La Veracidad se relaciona inversamente sólo al error sistemático.
- 3.-El término "Veracidad de medición" no debe usarse para "exactitud de medición".

**IV-10.3 Sesgo:** La diferencia entre los resultados de prueba esperados y el valor de referencia aceptado.<sup>[25]</sup>

**NOTA:** El sesgo es el error sistemático total en contraste con el error aleatorio. Puede existir uno o más componentes del error sistemático que contribuyen al sesgo. Una diferencia sistemática mayor con respecto al valor de referencia aceptado se refleja por un valor de sesgo más grande.

**IV-10.4 Error de medición / Error:** Diferencia del valor de magnitud obtenido por medición y el valor verdadero del mensurando.

*NOTA: Es necesario distinguir "error de medición" del "error relativo de medición". Se pueden distinguir dos tipos de errores los sistemáticos y los aleatorios.<sup>[26, 27]</sup>*

**IV-10.5 Errores sistemáticos:** Dan lugar a una desviación o sesgo (bias) siempre en el mismo sentido, de los resultados obtenidos respecto del valor verdadero. Afectan a la veracidad de los resultados y con ello a la exactitud. Pueden ser constantes o proporcionales, en el primer caso el error es independiente de la concentración del analito mientras que en el segundo caso existe una dependencia con respecto a la concentración del analito presente. Errores de este tipo serian la presencia de contaminación, errores en la curva de calibrado, o pérdida mecánica del analito. No hay unanimidad internacional al respecto.<sup>[13]</sup>

**IV-10.6 Errores aleatorios:** No pueden predecirse y varían de signo y magnitud. Se evidencian cuando al realizar una serie de análisis repetitivos de una misma muestra se obtienen resultados que oscilan alrededor de un valor central. A medida que aumenta el número de repeticiones, el efecto de los errores aleatorios sobre medidas que estiman el valor central, tiende a disminuir, dado que se compensan unos con otros. La presencia de errores aleatorios afecta la precisión de los resultados.<sup>[13]</sup>

**IV-10.6.1 Error aleatorio de medición /error aleatorio:** Diferencia del valor de una magnitud obtenida por medición y el promedio o que se obtendrían de un número infinito de réplicas de mediciones del mismo mensurando realizados bajo condiciones de repetibilidad.<sup>[27]</sup>

**NOTAS:**

- 1.-Los errores aleatorios de una serie de replicas de mediciones que forman una distribución que puede describirse por una varianza, y tiene una expectación de cero.
- 2.-Error aleatorio es igual a la diferencia del error de medición y el error sistemático de medición.

**IV-10.7 Método de referencia:** Es un método ampliamente investigado, que describe clara y exactamente las condiciones y procedimientos necesarios, para la medición de uno o más valores de la propiedad, que han demostrado tener exactitud y precisión de acuerdo con su propósito de uso y que puede, por lo tanto, ser usado para evaluar la exactitud de otros métodos por la misma medición, permitiendo en particular la caracterización de un Material de Referencia.<sup>[2,3]</sup>

**IV-10.8 Material de referencia certificado:** Material de referencia acompañado de un certificado, en el cual uno o más valores de sus propiedades están certificados por un procedimiento que establece trazabilidad a una realización exacta de la unidad en la cual se expresan los valores de la propiedad y en la que cada valor certificado se acompaña de una incertidumbre con un nivel declarado de confianza.<sup>[2,3]</sup>

*CRITERIO 1: Existen 2 tipos de MRC, los que se utilizan para elaborar curvas de calibración y dar trazabilidad a las mediciones, los cuales son regularmente en matrices simples y de alta concentración y los MRC para control de calidad los cuales son matrices reales (suelo, agua de mar, sangre humana, hígado de pato, etc.) a la cual se les ha agregado o contienen una(s) sustancia(s) químicas en concentraciones en las que se encuentran en las muestras reales y que regularmente se utilizan para control de calidad o pruebas de aptitud, los valores, incertidumbres, homogeneidad y estabilidad de ambos deben ser determinadas por un laboratorio primario o nacional o un organismo competente aprobado por ellos. Para llevar a cabo los programas de control de calidad el uso principal*

*de los MRC de Control de Calidad es para asegurar la confiabilidad de sus mediciones con cierta periodicidad, y rutinariamente se pueden utilizar MR para llevar su control estadístico. Para demostrar trazabilidad en una medición química el laboratorio requiere utilizar MRC para la elaboración de curvas de calibración (o en la ejecución de cualquier otro método de calibración química).*

**CRITERIO 2:** *El certificado de un MRC debe especificar claramente el valor certificado, la incertidumbre correspondiente con un nivel de confianza declarado. El método utilizado para la determinación del valor certificado, analito al que corresponde el valor certificado, matriz, recomendaciones de uso, limitaciones, fecha de caducidad, entre otros.*

# ANEXO V

## REGRESIÓN LINEAL

### V-1 MÉTODO DE MÍNIMOS CUADRADOS<sup>[11,29]</sup>

La mayoría de los métodos analíticos se basan en una curva de calibración en la que una cantidad medida "y" se representa en función de la concentración conocida "x" de una serie de patrones. Con lo cual se hace una curva de calibración típica. Lo más habitual (y deseable) es que la gráfica se aproxime a una línea recta. Sin embargo no todos los datos quedan exactamente sobre dicha línea debido a los errores aleatorios del proceso de medida. Por lo tanto, se debe intentar ajustar la "mejor" línea recta que pase a través de los puntos. La forma más habitual de encontrar dicha línea es utilizar el método de mínimos cuadrados. Al aplicar éste se supone que la línea recta es un buen modelo para relacionar el área de los picos (y) y la concentración del analito (x) que viene dada por la ecuación.

$$y = mx + b$$

En la que "m" es la pendiente de la línea recta y "b" la ordenada en el origen. La pendiente y la ordenada se conocen como parámetros del modelo, que, en este caso corresponde a una línea recta. También se supone que cualquier desviación de los puntos individuales respecto a la línea recta, proviene del error en los valores de "x", esto es, que las concentraciones de las disoluciones estándar se conocen exactamente. La desviación vertical de cada punto respecto a la línea recta se denomina residual. La línea obtenida por el método de mínimos cuadrados es aquella que minimiza la suma de los cuadrados de los residuales de todos los puntos. Por conveniencia se definen tres cantidades  $S_{xx}$ ,  $S_{yy}$  y  $S_{xy}$  y tal como sigue:

$$S_{xx} = \sum (x_i - \bar{x})^2 = \sum x_i^2 - (\sum y_i)^2/n \quad (\text{ec1})$$

$$S_{yy} = \sum (y_i - \bar{y})^2 = \sum y_i^2 - (\sum y_i)^2/n \quad (\text{ec2})$$

$$S_{xy} = \sum (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y}) = \sum x_i y_i - (\sum x_i \sum y_i)/n \quad (\text{ec3})$$

En estas ecuaciones  $x_i$  y  $y_i$  son las coordenadas de los puntos correspondientes a los datos individuales, n es el número de pares de datos utilizados al preparar la curva de calibración y  $\bar{x}$  y  $\bar{y}$  son los valores promedio de las variables, o

$$\bar{x} = \sum x_i/n \quad \text{y} \quad \bar{y} = \sum y_i/n$$

Obsérvese que  $S_{xx}$ ,  $S_{yy}$  son las sumas de los cuadrados de las desviaciones respecto de la media de los valores individuales de x e y. Cuando se usa una calculadora de bolsillo, es más conveniente utilizar los miembros que aparecen en el extremo derecho de las ecuaciones 1, 2 y 3.

A partir de  $S_{xx}$ ,  $S_{yy}$  y  $S_{xy}$  pueden calcularse seis parámetros muy útiles.

1.- La pendiente de la recta, m:

$$m = S_{xy}/S_{xx} \quad (\text{ec4})$$

2.- La ordenada en el origen, b:

$$b = \bar{y} - m \bar{x} \quad (\text{ec5})$$

3.- La desviación estándar de la regresión, o el error estándar del cálculo de los residuales  $s_b$  ( $y_c - mx - b$ ):



$$s_e = \sqrt{\frac{S_{yy} - m^2 S_{xx}}{n-2}} = \sqrt{\frac{S_{yy} - \frac{(s_{xy})^2}{S_{xx}}}{n-2}} \quad (\text{ec6})$$

4.- La desviación estándar de la pendiente  $s_m$ :

$$s_m = s_e / \sqrt{S_{xx}} \quad (\text{ec7})$$

5.- La desviación estándar de la ordenada en el origen  $s_b$ :

$$s_b = s_e \sqrt{\frac{\sum x_i^2}{n \sum x_i^2 - (\sum x_i)^2}} = s_e \sqrt{\frac{1}{n - (\sum x_i)^2 / \sum x_i^2}} \quad (\text{ec8})$$

6.- La desviación estándar de los resultados analíticos  $s_c$  obtenidos a partir de los parámetros de los datos ajustados por mínimos cuadrados:

$$s_c = \frac{s_e}{m} \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{(y_c - \bar{y})^2}{m^2 S_{xx}}} \quad (\text{ec9})$$

La ecuación 9 permite calcular la desviación estándar de la media  $\bar{y}_c$ , de un conjunto de  $m$  análisis replicados cuando se usa una curva de calibración de  $n$  puntos; recuérdese que  $\bar{y}$  es el valor de la media de  $y$  para los  $n$  datos de la calibración.

## V-2 INTERVALO DE CONFIANZA SOBRE LAS ESTIMACIONES DE UNA RECTA.

Intervalo de confianza sobre la ordenada al origen y pendiente. Se puede demostrar estadísticamente que estas variables siguen una distribución  $t$ , por lo que los intervalos de confianza estarán dados por:

$$\text{Intervalo de confianza sobre la ordenada} \quad \beta = b \pm t_{\alpha/2} \cdot s_e \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{\bar{x}^2}{S_{xx}}}$$

$$\text{Intervalo de confianza sobre la pendiente} \quad \mu = m \pm t_{\alpha/2} \cdot s_e \frac{1}{\sqrt{S_{xx}}}$$

donde  $t_{\alpha/2}$  es el valor de la función  $t$  de student, con un riesgo  $\alpha$  y  $n-2$  grados de libertad,  $n$  es el número de parejas experimentales y  $S_e$ ,  $\bar{x}^2$  y  $S_{xx}$  se calculan según las ecuaciones anteriores.

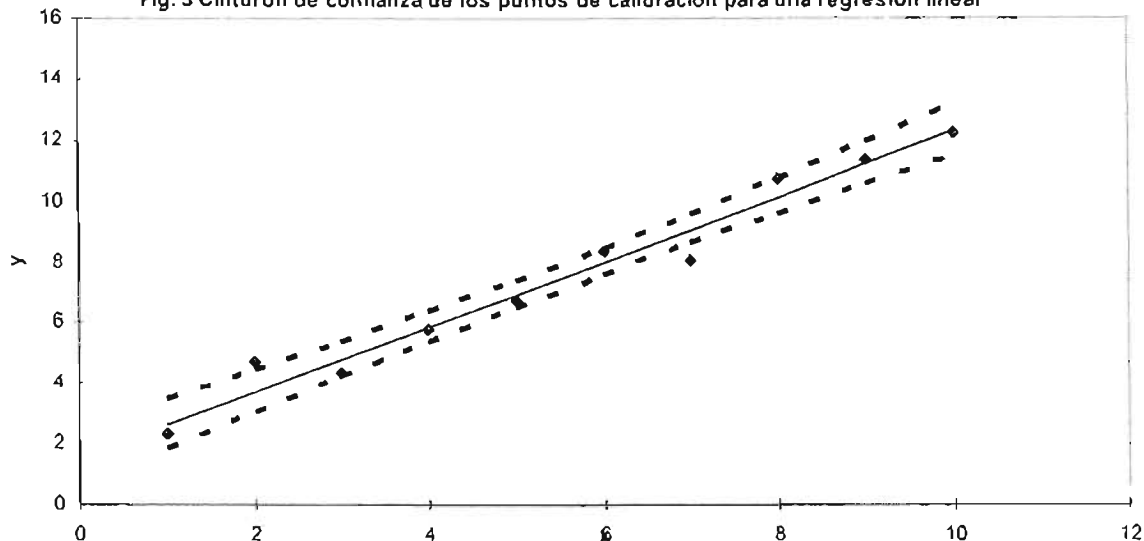
## V-3 INTERVALO DE CONFIANZA SOBRE LOS VALORES DE CALIBRACIÓN.

Se conoce comúnmente como cinturón de confianza (fig. 3) y se usa cuando se desea saber si un punto de calibración  $(x_{stdr}, y_{stdr})$  está fuera de la recta y se puede rechazar como valor aberrante. Se calcula con la ecuación:

$$y_{stdr} = (m \cdot x_{stdr} + b) \pm t_{\alpha/2} \cdot s_e \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{(x_{stdr} - \bar{x})^2}{S_{xx}}}$$

Si un punto de la curva de calibración queda fuera del cinturón de confianza, puede rechazarse con un riesgo  $\alpha$ .

Fig. 3 Cinturón de confianza de los puntos de calibración para una regresión lineal

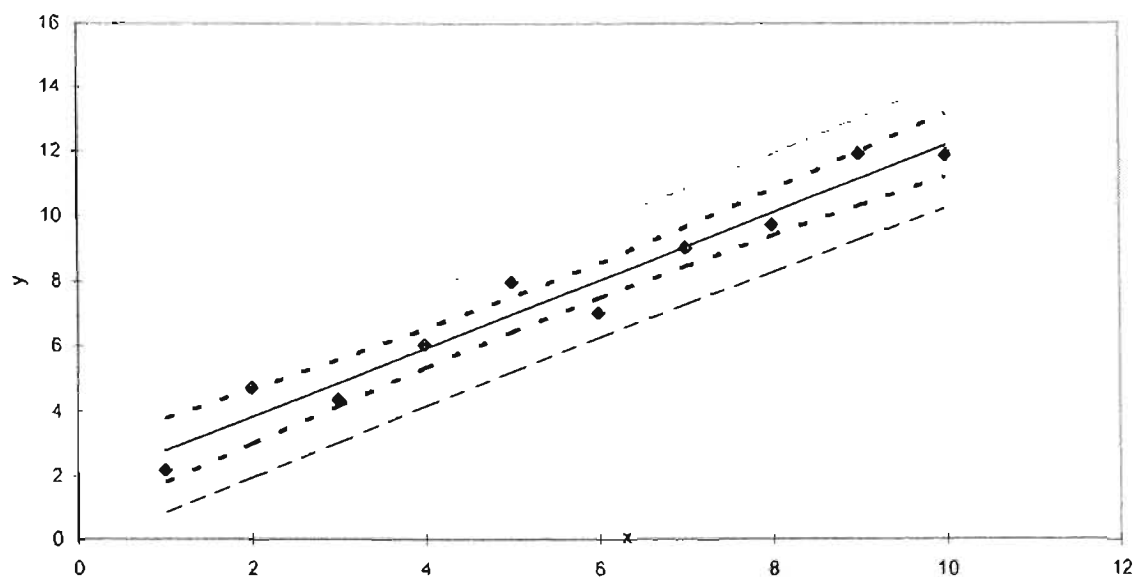


#### V-4 LÍMITES DE PREDICCIÓN DE UNA REGRESIÓN LINEAL.

Cuando se usa posteriormente la curva de calibración para medir muestras problema (sólo se conoce  $x_{mtra}$  y se estima  $y_{mtra}$  con la recta), el intervalo de predicción es mayor al cinturón de confianza de los valores de calibración, se le llama cinturón de predicción (cinturón más alejado de la recta en la Fig.4) y está dado por la ecuación:

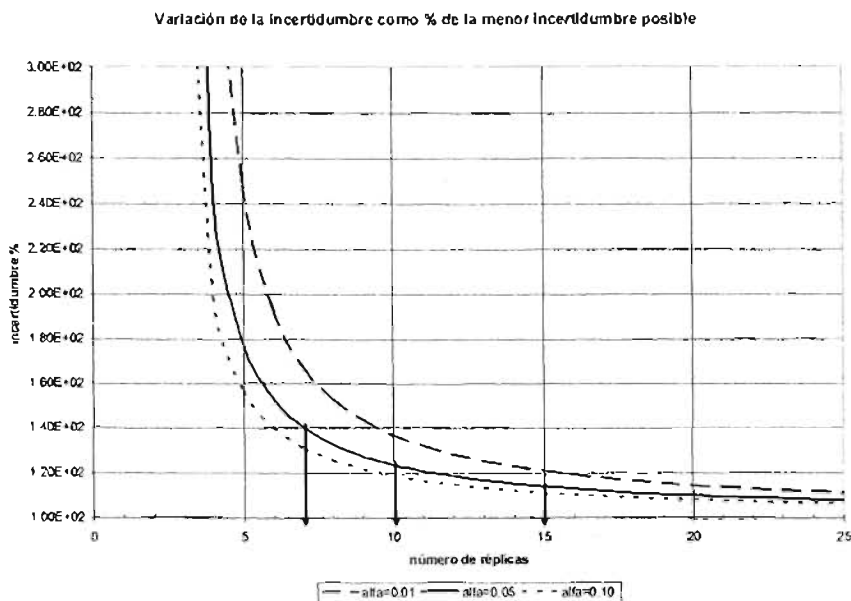
$$y_{mtra} = (m \cdot x_{mtra} + b) \pm t_{\alpha/2} \cdot s_e \sqrt{1 + \frac{1}{n} + \frac{(x_{mtra} - \bar{x})^2}{S_{xx}}}$$

Fig. 4. Cinturones de confianza y predicción para la regresión lineal



ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA

Este intervalo de predicción se utiliza mucho, ya que es el que PERMITE ESTIMAR LA INCERTIDUMBRE de las mediciones de problemas que se realizan. Esta incertidumbre depende no del número de réplicas que se realicen sobre una medición, sino del número de estándares que se utilicen para obtener la recta de calibración. El efecto del número de parejas (x,y) sobre el intervalo de predicción se muestra en la figura 5:



Esta figura muestra que para riesgos típicos, el número de puntos de calibración que se deben utilizar para obtener una recta aceptable es siete, pero que resulta preferible utilizar de diez a quince. Nuevamente, el uso de demasiados puntos (más de veinte) sólo mejora marginalmente la calidad de los resultados.

Otra consecuencia importante de esta ecuación, es que al tener un estimador de la incertidumbre de las mediciones, ya no se necesitan muchas réplicas de cada muestra problema. Si se tienen buenas rectas de calibración (cinturones de predicción estrechos), basta con usar duplicados, pero sólo para comprobar que no existe diferencia significativa entre ellos. Si las muestras no son suficientemente homogéneas, los duplicados saldrían significativamente diferentes y entonces de nuevo se necesitaría un buen número de réplicas de cada muestra para tener buenos estimadores, algo que no conviene y se debe evitar teniendo métodos de alta precisión y muestras homogéneas y representativas.

Finalmente, la forma del cinturón, que proporciona menos error en la zona central, indica que se debe ser muy cuidadoso al escoger el intervalo de las soluciones de calibración. Éstas deben ser tales que se tengan estándares con concentraciones inferiores a las de las muestras problema y otros con concentraciones superiores. Además es preferible, para asegurar el comportamiento lineal de la técnica, que los estándares estén igualmente espaciados en todo el intervalo de calibración.

#### V-5 PRUEBAS DE HIPÓTESIS SOBRE LAS ESTIMACIONES DE UNA RECTA.

Nuevamente se pueden hacer pruebas de hipótesis, ahora sobre la ordenada, la pendiente, un valor de calibración o una muestra problema. Un ejemplo típico es la prueba de exactitud de un método cuando

se está validándolo. En este caso, lo que se hace es aplicar el método sobre muestras reales de concentración conocida, o sobre muestras sintéticas que simulan las reales. La curva de calibración que se analiza es una de concentración real contra concentración medida; en teoría, si el método es exacto, la ecuación debería ser: Conc. Medida = Conc. Real. Es decir, una recta de pendiente uno y ordenada cero. Si estadísticamente no son iguales a estos valores, indicaría errores sistemáticos de nuestro método analítico, que se clasifican según la tabla:

Resultados de las pruebas de hipótesis sobre la recta: (Conc. Medida) = m*(Conc. Real) + b	Tipo de error que presenta el método
m > 1	Error sistemático proporcional por exceso.
m < 1	Error sistemático proporcional por defecto.
b > 0	Error sistemático constante por exceso.
b < 0	Error sistemático constante por defecto.

Como quiera que sea, si bien este tipo de errores no son deseables, e indican problemas del método que se debe corregir, La ecuación obtenida para esta recta puede emplearse como un factor de corrección para estimar las concentraciones reales usando las concentraciones medidas por nuestro método, siempre que el error sistemático siga siendo el mismo para otras muestras, algo muy cuestionable.

#### V-6 ESTADÍSTICOS DE PRUEBA PARA REGRESIÓN LINEAL.

Se utiliza la t de student, comparando la  $t_{exp}$  calculada contra la t de tablas. La t de student calculada depende de cual sea la variable sobre la que se esté planteando una hipótesis:

Hipótesis sobre:	Estadístico de prueba t:
Ordenada	$t_{exp} = \frac{(b - \beta)}{s_c \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{\bar{x}^2}{S_{xx}}}}$
Pendiente	$t_{exp} = \frac{(m - \mu)}{s_c} \sqrt{S_{xx}}$
Punto de calibración $x_{std}$ , $y_{std}$ , (valor aberrante, estándar fuera del intervalo lineal, etc.)	$t_{exp} = \frac{y_{std} - (m \cdot x_{std} + b)}{s_c \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{(x_{std} - \bar{x})^2}{S_{xx}}}}$
Muestra problema (uso de la curva de calibración para medir muestras reales)	$t_{exp} = \frac{y_{mtra} - (m \cdot x_{mtra} + b)}{s_c \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{(x_{mtra} - \bar{x})^2}{S_{xx}}}}$

La hipótesis nula  $H_0$  es, como siempre, de igualdad ( $b = 0$ ,  $m = 1$ ,  $C_{medida} = C_{real}$ , etc.). El criterio de decisión depende de la hipótesis alterna, pero la tabla es la misma que para las pruebas sobre una media:

Hipótesis alterna	Rechazamos la hipótesis nula si:
Variable menor a la referencia	$t_{exp} < -t_{\alpha}$
Variable mayor a la referencia	$t_{exp} > t_{\alpha}$
Variable diferente a la referencia	$t_{exp} < -t_{\alpha/2}$ ó $t_{exp} > t_{\alpha/2}$