



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**Análisis comparativo de dos guías de validación:  
La Adecuación al Uso de los Métodos Analíticos  
(Guía EURACHEM)**

**vs**

**Guía de validación de métodos analíticos  
(Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos  
México, A.C.)**

**T E S I S I N A**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
QUÍMICO**

**P R E S E N T A:**

**PEDRO ALBERTO PARRA SOLIS**

**ASESOR DEL TEMA:**

**DR. EDUARDO RODRIGUEZ DE SAN MIGUEL  
GUERRERO**

**CIUDAD UNIVERSITARIA, Cd. Mx., 2021**





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: Rodríguez De San Miguel Guerrero Eduardo**

**Vocal: Ceniceros Gómez Agueda Elena**

**Secretario: Peña Álvarez Araceli Patricia**

**1er. Suplente: Diaz Flores Luis Alejandro**

**2ndo. Suplente: Tapia Mendoza Everardo**

**Asesor del tema: Rodríguez De San Miguel Guerrero Eduardo**

## **Dedicatoria**

Dedico esta tesina a mi madre Lilia y mi padre Pedro, quienes con tanta paciencia, amor y cariño me apoyaron en todas las decisiones de mi vida, me enseñaron muchas cosas de la vida, así como me consintieron con todos los caprichos que siempre les pedía y siempre estuvieron ahí para mí.

A mis hermanos Omar y Any con quienes he compartido gran parte de mi vida, siempre procurando apoyarnos en lo que pudiéramos, y aunque la mayor parte del tiempo peleáramos nunca nos impidió pasar mucho tiempo de calidad jugando y aprendiendo unos de los otros.

A mis abuelos Filiberto y Lidia quienes ya no están aquí, para ellos que siempre nos quisieron a mí, a mis padres y mis hermanos, que velaron por nuestra seguridad en muchos momentos de nuestras vidas y con quienes pasamos momentos inolvidables.

A mi colega Roberto, Dany, Triste, Chiapas, Pedrolex, Dante, Daza, Chia y Rafa los cuales me enseñaron tantas cosas que desconocía, con quienes compartí muchos momentos de felicidad, alegría y preocupación durante el periodo de la universidad a todos y cada uno de ellos que me ayudaron a forjar el tipo de persona que soy hoy.

A mi novia Dafy con quien pase muchas aventuras y seguimos pasando, que me apoyo y motivo durante la carrera.

## **Agradecimientos**

Agradezco al doctor Eduardo Rodríguez de San Miguel, quien me permitió realizar el presente trabajo para obtener mi título.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por la formación que me ha brindado y a todos y cada uno de los profesores que me impartieron las materias durante la carrera.

# Índice

Resumen .....	1
Introducción .....	2
Marco teórico .....	3
<b>Métodos instrumentales de análisis</b> .....	3
<b>Determinación de Concentración de un analito</b> .....	3
<b>Técnicas Analíticas</b> .....	4
Conductimetría .....	4
Potenciometría .....	4
Voltamperometría.....	5
Cromatografía .....	5
Espectroscopia Ultravioleta Visible .....	5
Espectroscopia de Absorción atómica .....	6
Espectroscopia de Emisión atómica. ICP-Óptico.....	6
ICP-Masas .....	7
<b>Trazabilidad química</b> .....	7
<b>Validación de métodos analíticos</b> .....	8
Objetivos.....	11
Resultados.....	11
Discusión de Resultados.....	28
<b>Comparativa Selectividad/Especificidad</b> .....	28
Potenciometría .....	29
Conductimetría .....	29
Voltamperometría.....	30
Cromatografía .....	30
Espectroscopia UV-Visible.....	30
Espectroscopia de Absorción atómica .....	30
Emisión atómica. ICP-OES .....	31
ICP-Masas .....	31
<b>Comparativa Límite de Detección</b> .....	31
<b>Comparativa Limite de Cuantificación</b> .....	33
<b>Comparativa Repetibilidad</b> .....	35

<b>Comparativa Precisión Intermedia.....</b>	<b>36</b>
<b>Comparativa Veracidad (Exactitud para la guía QFB's).....</b>	<b>36</b>
<b>Comparativo intervalo de trabajo lineal y linealidad del sistema y método.....</b>	<b>38</b>
<b>Comparativa Robustez .....</b>	<b>40</b>
<b>Propuesta de orden de parámetros. ....</b>	<b>49</b>
<b>Conclusiones .....</b>	<b>51</b>
<b>Bibliografía.....</b>	<b>52</b>

## Glosario

<b>EURACHEM:</b>	Red de organizaciones de Europa enfocadas a la trazabilidad de mediciones químicas.
<b>CENAM:</b>	Centro Nacional de Metrología de México, laboratorio nacional de referencia en materia de mediciones.
<b>QFB's:</b>	Químicos Farmacéuticos Biológicos.
<b>LD:</b>	Límite de Detección.
<b>LC:</b>	Límite de Cuantificación.
<b>A:</b>	Absorbancia.
$\epsilon$ :	Coefficiente de Absortividad Molar.
$l$ :	Longitud del paso óptico.
$c$ :	Concentración.
<b>Sb:</b>	Desviación estándar del blanco.
<b>S<sub>0</sub>:</b>	Desviación estándar.
<b>S:</b>	Desviación estándar de la muestra.
<b>n:</b>	Número de mediciones.
$\mu$ :	Media aritmética de las mediciones.
$\bar{x}$ :	Media aritmética de las mediciones.
<b>CV:</b>	Coefficiente de Variación.
<b>IC:</b>	Intervalo de Confianza.
$\beta$ :	Pendiente de la recta de calibrado.
$\beta_0$ :	Ordenada al origen de la recta de calibrado.
<b>b:</b>	Sesgo.
<b>R:</b>	Recobro.
<b>MR:</b>	Material de Referencia
$r^2$ :	Coefficiente de determinación de la recta de calibrado.
$\kappa$ :	Coefficiente de selectividad en potenciometría.
<b>Rs:</b>	Resolución de picos en cromatografía.
$t_r$ :	Tiempo de retención.

<b>W:</b>	Ancho de pico.
<b>t:</b>	T de Student.
<b>MDL:</b>	Límite de detección del método.
<b>RSD:</b>	Desviación Estándar Relativa.
<b>Error Tipo 1:</b>	Probabilidad de rechazar una hipótesis nula verdadera.
<b>Error Tipo 2:</b>	Probabilidad de aceptar una hipótesis nula falsa.
<b>Y<sub>yi</sub>:</b>	Valor respuesta sin cambios en el método.
<b>Y<sub>y0</sub>:</b>	Promedio de los valores.
<b>GL:</b>	Grados de libertad.
<b>F:</b>	F de Fisher.
<b>nr:</b>	Número de repeticiones.
<b>SE:</b>	Estimador del efecto.
<b>i :</b>	i-ésimo elemento.



## **Resumen**

En el presente trabajo se analizaron los parámetros de desempeño para la validación de un método analítico usando dos guías de validación diferentes, la guía EURACHEM utilizada por El Centro Nacional de Metrología (CENAM) y la guía editada por el Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biológicos México AC, esto nace de la necesidad de entender los conceptos presentados por ambas para su correcta aplicación en una diversidad de técnicas analíticas que son utilizadas ampliamente por los laboratorios de análisis, asociado a esto también se discute acerca de las formas en la cuales pueden ser presentados los resultados y cuáles son las mejores estrategias para llevar a cabo la validación total de un método. Se recopilan los distintos enfoques con los cuales están diseñadas las guías y como esto afecta a quién este realizando la validación de un método analítico.

Para la comparación de los parámetros presentes en cada guía, se empataron los parámetros similares ambas guías y se discutieron las diferencias, los cálculos sugeridos y los cálculos propuestos a partir de distintos artículos. Se concluyo que existe una necesidad de armonización de las guías, particularmente dirigida a la guía editada por el Colegio de Químicos Farmacéuticos Biológicos tome en cuenta la trazabilidad de las mediciones químicas.

## Introducción

Los métodos instrumentales de análisis son una poderosa herramienta muy importante para el área de la química, en este periodo histórico de la humanidad gracias a la industrialización, el análisis químico es un requisito indispensable para la toma de decisiones, es decir, asegurar que los productos producidos sean seguros para su venta, que las condiciones ambientales sean aptas para permitir el libre tránsito de vehículos en una ciudad, la composición del suelo sea adecuado para producir cierto tipo de alimentos o la calidad del agua sea adecuada para su consumo entre otros ejemplos, el aseguramiento de la calidad en las mediciones químicas cobra protagonismo para la toma de estas decisiones críticas en las sociedades actuales.

Para lograr los objetivos del análisis es necesario elegir valores de referencias en función de algún requisito convenido para llevar a cabo comparaciones con las mediciones obtenidas y decidir si el método instrumental está cumpliendo su cometido o en cambio, si este no funciona para el propósito designado. Por esto se llegó a que la forma de demostrar que un método funciona es a través de la validación de métodos analíticos, esto es, justificar por medio de una serie de parámetros que un método es útil para el propósito designado, para esto las máximas entidades metrológicas diseñaron guías de validación que permiten evaluar el método puesto a prueba con la finalidad de acreditar que funciona para su propósito.

En nuestro país existen dos guías de validación de gran importancia, la guía EURACHEM utilizada por el Centro Nacional de Metrología (CENAM) y la Guía de Validación de Métodos Analíticos editada por el Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos utilizada por los asociados a este colegio. Ninguna guía explica la manera en la cual deben ser probados y controlados los parámetros de desempeño para las principales técnicas analíticas, sumado a ello ambas poseen enfoques distintos y no pueden ser aplicados de manera indiscriminada a cualquier método puesto a prueba.

En este documento se tratarán los parámetros de desempeño para la validación total de un método analítico comparando las guías previamente presentadas, abogando por la que mejor responda a las necesidades de quien sea encargado de la validación de métodos, las estrategias para la aplicación de los conceptos presentados en las guías a las principales técnicas analíticas y las propuestas de cálculos para la demostración de los parámetros de desempeño.

## **Marco teórico**

### **Métodos instrumentales de análisis**

La química analítica ha tenido un gran rol en el desarrollo humano en los últimos dos siglos, los avances en esta área de la química han permitido el progreso en áreas muy importantes como la medicina, la electrónica, la industria textil, la agricultura, ganadería, etcétera. La formulación de un medicamento producido a partir de un compuesto químico o la aleación de ciertos metales para la conformación de un circuito eléctrico siempre lleva consigo el análisis, caracterización y confirmación de que se ha obtenido el resultado esperado.

El análisis cuantitativo se basa principalmente en la medida de (1) reacciones químicas; (2) propiedades electroquímicas; (3) propiedades ópticas; (4) propiedades cuánticas; (5) o propiedades térmicas. Los métodos analíticos están clasificados en métodos clásicos y métodos instrumentales. Los métodos clásicos de análisis como la gravimetría y volumetría son basados en el término de reacciones químicas cuantitativas. Los métodos basados en la medida de una propiedad usando un instrumento son referidos como métodos instrumentales. Estos métodos incluyen, pero no están limitados al electroanálisis, la espectroscopia, la cromatografía y la medición de propiedades térmicas y nucleares (Moldoveanu & David, 2017).

El análisis instrumental ha acaparado una gran atención por la rapidez con la que los resultados son producidos y también del considerable ingenio detrás para aprovechar las características inherentes a las moléculas o átomos que componen los objetos de análisis. Los instrumentos son usualmente conectados a una computadora la cual actúa como un procesador de la información recibida desde el instrumento; en muchos casos las mediciones están totalmente automatizadas, desde la introducción de la muestra hasta el procesamiento de los datos (Shah et al., 2020).

### **Determinación de Concentración de un analito**

Principalmente, existen tres formas para determinar la concentración de un analito:

1. **Titulación**

Técnica analítica que se basa en la determinación de una sustancia en solución con un titulante de concentración conocida, el punto final se determina de manera instrumental, o visualmente, con la finalidad de determinar la concentración o cantidad de una sustancia en la muestra.

2. **Curva de Calibración**

Forma de determinación cuyo principio se basa en la construcción de estándares de concentración conocida, donde la respuesta analítica de cada uno de ellos se utiliza para modelar una ecuación de línea recta, la concentración desconocida de una muestra se obtiene al realizar una interpolación en dicha ecuación.

### 2.1 Curva de Calibración con Adición Patrón (estándar interno)

Es una forma de determinación similar a la curva de calibración con la salvedad que los estándares se adicionan junto a una sustancia que posee características similares al analito y de concentración conocida, la modelación de la línea recta estará compuesta por la respuesta analítica y el cociente de la concentración de analito entre la concentración del patrón.

### 3. Curva de Calibración con Adiciones de estándar

Forma de determinación donde al objeto de análisis se le adiciona intencionalmente cantidades conocidas de analito, al realizar la curva de calibración se extrapola hasta la ordenada al origen de la curva, el valor resultante es el valor negativo de la concentración desconocida del analito.

Cada una de las formas de determinación de analito se utiliza en función de la técnica analítica a emplear o naturaleza del objeto de análisis. El conjunto de los factores presentes antes, durante y después del proceso de medición definirá cuál es el mejor método de determinación que será utilizado.

## **Técnicas Analíticas**

### **Conductimetría**

Esta técnica monitorea la conductividad de una disolución (el recíproco de la resistencia). La propiedad medida, la conductancia, varía de acuerdo al número, el tamaño y la carga de los iones totales disueltos, también de las características del disolvente y de los fenómenos de transporte que sufren los iones en él (Volmer et al., 2017). Esta técnica es comúnmente utilizada en el monitoreo de titulaciones, ya sean ácido-base, precipitación y formación de complejos. La forma de determinar cuándo una titulación ha llegado a un punto de equivalencia es a través del principio donde la sustitución de un ion por otro, con características distintas, sigue una tendencia lineal con un cambio de pendiente en los valores de conductividad. La técnica es ampliamente utilizada en el monitoreo de titulaciones ácido-base (Ashour & Khateeb, 2013).

### **Potenciometría**

La potenciometría, como su nombre describe, es una técnica que mide el potencial de un sistema electroquímico en equilibrio para determinar la actividad de algunas sustancias en disolución, sin un paso de corriente apreciable. El sistema que comúnmente compone un potenciómetro consta de dos electrodos, un electrodo de referencia de potencial conocido y un electrodo indicador en el cual se mide la actividad directa o indirectamente de las especies presentes y a través del voltaje se proporciona información de la composición de la disolución. Dentro de los electrodos indicadores existen distintos tipos, cada uno con una aplicación diferente, entre los que destacan los electrodos indicadores metálicos y los selectivos a iones. Los electrodos metálicos son capaces de medir concentraciones de cationes metálicos de los que están hechos (primer orden), aniones con los

cuales formen precipitados con baja solubilidad (segundo orden) y el potencial impuesto por los pares redox presentes en la disolución (indicadores redox), mientras que los electrones selectivos, funcionan midiendo directamente la concentración de iones selectivamente frente a otros a través de un potencial eléctrico impuesto tanto por la concentración de analito como de la concentración dentro del electrodo. Esta técnica en particular se caracteriza por su portabilidad, bajo consumo de energía y bajo coste, que son características atractivas en lo que respecta a las aplicaciones prácticas (Bobacka et al., 2008).

### **Voltamperometría**

La voltamperometría es una técnica analítica electroquímica comúnmente empleada para investigar los procesos oxidación-reducción de especies moleculares y atómicas a través de una celda electroquímica. El sistema consta de un potenciostato, 3 electrodos (referencia, de trabajo y contraelectrodo) y una disolución donde se llevará a cabo los procesos de oxidación y reducción, la disolución entonces deberá contener, el disolvente designado para el análisis, un electrolito soporte que permita la migración de electrones hacia los electrodos y el analito (Elgrishi et al., 2018). La información obtenida de este método es la corriente medida en función del potencial aplicado, así se puede cualificar la presencia de una especie o la cantidad de analito presente a través del potencial oxidación-reducción, característico de cada especie. Para determinar la concentración de analito, comúnmente se lleva a cabo una curva de calibración con cantidades conocidas de analito midiendo la corriente producida en función de la concentración de analito, pero dependiendo de la matriz de cada analito es común realizar curvas de calibración con adiciones de estándar en el caso de matrices complejas (Wawrzyniak et al., 2005).

### **Cromatografía**

Las técnicas cromatográficas son una familia de técnicas cuyo principio se basa en la separación física de componentes de una mezcla a través de dos fases, una de estas fases en la forma de un sólido poroso, un líquido, una capa o filme, lo que comúnmente se le conoce como fase estacionaria, mientras la otra fase es un fluido que permea toda la fase estacionaria. La separación ocurre por los múltiples eventos que sufren los componentes de la mezcla de adsorción y desorción entre la fase estacionaria, la migración de la fase móvil y las interacciones que tengan cada uno de los componentes de la mezcla (Chromatography, 1997). De acuerdo con la fase móvil (gas, líquido y fluido supercrítico), la fase estacionaria (sólido, líquido y micelas) y el mecanismo de separación existen muchas formas de separación; aunado a ello la variedad de detectores que existen diseñados para monitorear la separación de todos los componentes, como la espectrometría de masas por ser el más universal o sólo la presencia de alguno de ellos, como el arreglo de diodos para componentes con una absorción de alguna longitud de onda en particular, la ubican como una de las técnicas más utilizadas debido a su versatilidad.

### **Espectroscopia Ultravioleta Visible**

La espectroscopia ultravioleta visible es una técnica simple, rápida y de muy bajo costo usada rutinariamente en química analítica para el análisis cuantitativo de diferentes analitos en disolución,

como iones metálicos, compuesto orgánicos altamente conjugados y macromoléculas biológicas (Kokosa, 2019). Su principio se basa en la interacción de los iones o moléculas con la radiación electromagnética producidas por una lámpara. Estas especies absorben la radiación lo que se traduce en un cambio energético de menor energía hacia uno de mayor energía a nivel de los electrones, donde algunos de ellos pasan de un orbital ocupado hacia un desocupado cuando la energía de los fotones iguala a la diferencia de energía entre los dos orbitales. La medición para realizar es la cantidad de radiación que pasa en ausencia del analito en comparación con la cantidad de radiación en presencia del analito a cierto nivel de concentración, a esta relación se le conoce como la ley de Lambert-Beer (ec. 1) donde la absorbancia está en función del paso óptico, la concentración del cromóforo y al coeficiente de absortividad del cromóforo (Edwards & Alexander, 2016), por consiguiente, la forma común de determinar concentraciones es a través de curvas de calibración.

$$A = \epsilon lc$$

**Ecuación 1.** Relación de Lambert-beer

### **Espectroscopia de Absorción atómica**

La absorción atómica como comúnmente se le llama, es una técnica empleada para determinar cuantitativamente la cantidad de metales a nivel de trazas en una disolución, volatilizando y atomizando por medio de una flama o un horno de grafito y posteriormente midiendo el espectro producido cuando la muestra es excitada por medio de radiación electromagnética proveniente de una lampara del elemento de interés. Los átomos presentes en la muestra, iguales a los de la lámpara que produce la radiación (aunque ocasionalmente puede haber interferencias con otros elementos), absorben la radiación lo cual provoca transiciones energéticas de sus electrones a orbitales más externos desocupados de mayor energía (García & Báez, 2012). Por lo tanto, los detectores miden las intensidades de una o varias longitudes de onda de la radiación que atraviesa la muestra y la compara con la intensidad de la radiación originaria que no pasa a través de la muestra. El calculo de la concentración obedece la misma relación de Lambert-beer utilizada en la espectroscopia Ultravioleta-Visible (ec. 1)

### **Espectroscopia de Emisión atómica. ICP-Óptico**

Esta técnica es un análogo a la absorción atómica, el procesamiento de muestra sigue los mismos pasos (volatilización y atomización), con la salvedad de que su método de detección se establece en la transición de los electrones de un nivel de mayor a uno de menor energía, la desexcitación de los electrones produce radiación electromagnética con características muy específicas para cada átomo (Ward, 1984) , para dar lugar a este proceso en vez de utilizar una flama o un horno de grafito, se utiliza un plasma de argón con temperaturas que rondan los 10,000 grados kelvin. Este plasma se genera colisionando electrones con átomos de argón por medio de un campo magnético y una radiofrecuencia se controla su producción (Cubadda, 2007). A estas temperaturas los procesos de ionización de los átomos producen líneas espectrales específicas para cada uno de ellos, no es necesario el uso de una lámpara para cada metal, en cambio se utiliza un sistema óptico que registra todas las líneas espectrales de átomos presentes en la muestra.

## **ICP-Masas**

De manera similar al ICP-Óptico, la técnica de ICP-Masas comparten el principio de ionización de átomos a altas temperaturas, pero en esta modalidad, una porción del plasma se hace pasar por dos conos, cuyo propósito es el de filtrar y dejar pasar a todos los iones y no a los compuestos que se forman, así como a los átomos de carga neutra. Una vez filtrados se guían a un espectrómetro de masas donde ocurre la separación y cuantificación de ellos con relación a su masa/carga (Ward, 1984)

## **Trazabilidad química**

La trazabilidad es una propiedad de los resultados de una medición o de los valores de un estándar que permite relacionarlo con referencias declaradas, normalmente estándares nacionales o internacionales, a través de una cadena de comparaciones sin interrupción, todas ellas con incertidumbres declaradas (VIM, 2012), es decir, para que los resultados de medidas sean significativos y comparables, es inherente la comparación de un valor desconocido con un estándar establecido y trazable (por ejemplo, un estándar de masa o una sustancia química pura), la cual actúa como un nexo entre el valor desconocido y el valor patrón nacional o internacional.

El propósito de las mediciones es el de la toma de decisiones y la incertidumbre de cada una es el riesgo asociado a tomar una decisión incorrecta. Hoy en día un requisito necesario para obtener la comparación de los resultados obtenidos para la toma de decisiones es la trazabilidad metrológica, como en la ciencia, la sociedad y el comercio múltiples comparaciones de resultados son realizadas diariamente, se requieren de conceptos y definiciones convenidas y aceptadas. Considerando que muchos de los resultados obtenidos se realizan en distintos lugares, en distintas épocas, por diferentes personas y a lo largo del tiempo, la forma de asegurar que estas mediciones cumplen con los requisitos mínimos necesarios para conseguir mediciones útiles es proveerlas de trazabilidad (De Bièvre & Günzler, 2005).

Para obtener trazabilidad en las mediciones se debe estudiar a fondo los siguientes supuestos cuando se lleve a cabo un determinado método analítico o procedimiento operativo estándar; (1) Entender las ecuaciones a utilizar para calcular los resultados analíticos, la trazabilidad de todos los parámetros que aparezcan en dicha ecuación deben ser tomados en cuenta; (2) Identificar que reactivos y equipo van a ser utilizados; (3) Identificar las condiciones experimentales del procedimiento analítico; (4) Obtener los estándares de referencia y medirlos, al igual que los valores desconocidos de las muestras que serán medidas por el método (De Bièvre & Günzler, 2005). Es importante señalar que el simple uso de estándares de referencia para realizar las comparativas no basta para conceder de trazabilidad a las mediciones, es indispensable demostrar que la medición se obtiene consistentemente por medio del control de calidad y la validación de cada uno de los supuestos.

## Validación de métodos analíticos

La validación de los métodos analíticos según La Guía “La Adecuación al Uso de los Métodos Analíticos” de la Eurachem es un requisito indispensable en la práctica de los análisis químicos. De ella se desprende que “El laboratorio debe utilizar los métodos de ensayo o de calibración, incluidos los de muestreo, que satisfagan las necesidades del cliente y que sean apropiados para los ensayos o las calibraciones que realiza.” (Örnemark, 2016) y además: “Cuando el cliente no especifique el método a utilizar, el laboratorio debe seleccionar los métodos apropiados...”, otra guía de validación importante cuyo uso es vigente, aunque no actualizado, la Guía de Validación de Métodos Analíticos hecha por el Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México, plantea el enfoque de que: “en el proceso de fabricación de un medicamento es necesario determinar los atributos de identidad, pureza, concentración, potencia, inocuidad y disponibilidad para cumplir con aspectos normativos oficiales e internos”, por lo que si un método analítico, el cual mide cada una de estas cualidades, no es confiable se corre el riesgo de afectar al usuario final, y desde el contexto de desarrollo de fármacos se explica que la validación de métodos analíticos es un sistema involucrado en los procesos de fabricación en el área de calidad de la empresa, cuyo objetivo final es la liberación o no liberación de un producto sobre la base de las especificaciones previamente establecidas, cuya decisión final reside en los resultados y veracidad de estos. Por lo tanto, la validación le proporciona, a quien aplica la metodología, una seguridad de la confiabilidad de dichos métodos y puede tomar la decisión final con certeza (García et al., 2002). Aunque ambas guías tengan enfoques distintos, estas comparten que las medidas analíticas deben ser hechas para satisfacer un requisito convenido entre una empresa, operario o analista con un cliente ya sea, industria, gobierno o académico cuyos resultados permitan satisfacer un propósito determinado y/o tomar una decisión con la máxima certidumbre de éstos (Thompson et al., 2002).

Si bien aparecen de manera implícita en ambas guías, existen eslabones que nos permiten juzgar si una medición o análisis se está efectuando de manera objetiva:

- Las medidas analíticas hechas en un lugar deben ser consistentes con las efectuadas en otra parte del mundo.
- Quienes hacen medidas analíticas deben tener controles de calidad bien definidos y procedimientos de garantía de calidad.
- Las medidas analíticas se deben efectuar utilizando equipos y métodos que han sido probados para asegurar que funciona para su propósito.
- Las mediciones deben ser realizadas por personal capacitado y competente que demuestre que puede realizar el análisis correctamente.

De acuerdo con la norma ISO 17025 la validación de métodos es la confirmación mediante examen y la aportación de pruebas objetivas de que se cumplen los requisitos particulares para el uso específico previsto (Gašlje, 2010). De este modo se engloba los eslabones previamente mencionados y por lo tanto es necesario llevar a efecto la presentación del cumplimiento de los requisitos. Estos requisitos se traducen en parámetros de validación, que representan los requisitos mínimos necesarios para que se compruebe con la mayor veracidad de que un método es adecuado, confiable y lo suficientemente preciso para el propósito designado.

Actualmente existen muchas guías de validación de métodos, de las más importantes resaltan la guía de la Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA por sus siglas en inglés), el Consejo



Internacional de Armonización (ICH por sus siglas en inglés), la Farmacopea de los Estados Unidos (USP), la Organización Internacional de Estandarización (ISO), la Asociación de Químicos Analíticos (AOAC), y para mayor interés de nuestro país, La Adecuación al Uso de los Métodos Analíticos por la EURACHEM utilizada por el máximo laboratorio de referencias a nivel nacional, el Centro Nacional de Metrología (CENAM), y la Guía de Validación de Métodos Analíticos editada por el Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México. Todas ellas comparten que los parámetros mínimos necesarios para la validación de un método de análisis químico son:

- Especificidad/ Selectividad
- Linealidad
- Rango
- Límite de Detección
- Límite de Cuantificación
- Veracidad
  
- Precisión ○ Repetibilidad ○ Precisión Intermedia ○ Reproducibilidad
- Robustez
- Sensibilidad
- Tolerancia

Cada una de las guías posee sus propias definiciones y criterios de aceptación, no siendo claras las necesidades del analista y el tipo de análisis instrumental que será puesto a prueba. Por esta razón, primeramente, se tiene que examinar cuál es el propósito del método o el resultado que se busque. Después se tiene que determinar la naturaleza del analito, la cantidad de analito, la matriz donde se encuentra inmerso y las posibles interferencias presentes. Finalmente se debe proponer un método, ya sea utilizando un método normalizado que con la demostración de pocos parámetros de validación se mostrará que funciona para el propósito; un método validado, pero no diseñado para el propósito donde con más parámetros de validación se demostrará que funciona para el propósito, o desarrollar un nuevo método en donde todos los parámetros serán puestos a prueba con el objetivo de obtener un método adecuado para el propósito. Dependiendo el método a utilizar la demostración de los parámetros de validación fungirán como la evidencia objetiva de que el método funciona bajo las condiciones del laboratorio donde se está llevando a cabo.

Actualmente se consideran 5 tipos de validación y con base a ello los parámetros que deben ser puesto a prueba:

- Uso de Método Normalizado: Pocos parámetros de desempeño como certeza y precisión
- Uso de Método Normalizado, pero con diferente matriz: Selectividad, Certeza, Precisión, límite de detección
- Establecido, pero no probado: la mayoría de los parámetros
- De la bibliografía sin referencia a parámetros de desempeño: la mayoría de los parámetros
- Método desde cero: todos los parámetros

Sumado a esto, es lógico decidir el esquema de parámetros que serán validados de acuerdo con el propósito del método, es decir, dependiendo el tipo de resultado que se busque, no será necesario evaluar todos los parámetros de desempeño. Se consideran comúnmente cuatro categorías en las cuales se pueden agrupar los fines de la aplicación de los métodos analíticos (USPC Official, 2008);

- Categoría I: Procedimientos analíticos para cuantificar un compuesto mayoritario
- Categoría II: Procedimientos analíticos para cuantificar impurezas
- Categoría III: Procedimientos analíticos para determinar características fisicoquímicas
- Categoría IV: Procedimientos analíticos para realizar test de identificación

Parámetros de desempeño	Categoría I	Categoría II (Cuantitativo)	Categoría II (impurezas límite)	Categoría III	Categoría IV
<b>Selectividad</b>	Si	Si	No (pero puede ser requerido)	No	Si
<b>Veracidad</b>	Si	Si	Si	No	No
<b>Linealidad</b>	Si	Si	No	No	No
<b>Precisión</b>	Si	Si	No	Si	No
<b>Límite de cuantificación</b>	Si	Si	No	No	No
<b>Límite de detección</b>	No	Si	Si	No	No
<b>Robustez</b>	Si	Si	Si	Si	Si

**Tabla 1.** Parámetros de desempeño a evaluar dependiendo el tipo de categoría del método analítico

## **Objetivos**

### **General**

Realizar una comparativa de las guías de validación “La Adecuación al Uso de los Métodos Analíticos: Una Guía de Laboratorio para Validación de Métodos y Temas Relacionados” de EURACHEM (traducida por el CENAM) y la “Guía de Validación de Métodos Analíticos” editada por el Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México.

### **Particulares**

Analizar los diferentes parámetros de desempeño en el contexto de sus definiciones en ambas guías.

Proporcionar información de utilidad para la implementación de dichas definiciones en el ámbito de su aplicación por los laboratorios de prueba a lo largo de diferentes técnicas analíticas.

### **Resultados**

Los resultados serán separados por dos columnas, cada una representando las guías que serán analizadas, en las cuales se comparan las definiciones, los métodos de determinación, es decir el cálculo o serie de cálculos que hay que realizar sobre los datos crudos obtenidos, y los criterios de aceptación que deben tener los resultados del análisis previamente realizado para decidir si estos cumplen con su cometido.

Algunos parámetros se agruparon y compararon debido a la similitud en las definiciones que presentaban:

1. Parámetro de Veracidad De la Guía EURACHEM equivalente al Parámetro de Exactitud en la Guía de Químicos Farmacéuticos Biológicos
2. Parámetro de Intervalo de trabajo de la guía EURACHEM equivalente al Parámetro de Linealidad de la Guía de Químicos Farmacéuticos Biológicos

<b>Parámetros de desempeño</b>	<b>Documento (1)</b>	<b>Documento (2)</b>
	La Adecuación al Uso de los Métodos Analíticos Una Guía de Laboratorio para Validación de Métodos y Temas Relacionados 2016	Guía de Validación de Métodos Analíticos editada por el Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México AC 2002
<b>Selectividad (Especificidad para el caso de la guía QFB'S)</b>		
<b>Definición</b>	Es el grado en el que un método puede ser utilizado para determinar analitos particulares en mezclas o matrices sin interferencias de otros componentes de comportamiento similar	Capacidad de un método analítico para obtener una respuesta debida únicamente al analito de interés y no a otros componentes de la muestra.
<b>Método de Determinación</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Analice muestras de ensayo y Materiales de Referencia por el método candidato y otros métodos independientes.</li> <li>• Analice muestras de ensayo conteniendo varias interferencias sospechadas en la presencia de los analitos de interés</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Se deben establecer las posibles sustancias interferentes, y adicionar cantidades conocidas de éstas, solas o combinadas a la muestra y evaluar su respuesta al método, bajo las mismas condiciones de análisis.</li> <li>• Se deben seleccionar sustancias que potencialmente interfieran en la determinación con base en la estructura molecular del analito, precursores, sustancias relacionadas, vías degradativas, entre otros.</li> </ul>
<b>Criterios de Aceptación</b>	Si la detección o cuantificación es inhibida por las interferencias, será necesario continuar con el desarrollo del método.	La respuesta del método únicamente debe ser debida al analito.

Límite de Detección	Documento (1)	Documento (2)
<b>Definición</b>	Es la concentración más baja del analito que puede ser detectada por el método a un nivel de confianza especificado	Concentración mínima del analito en una muestra, que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, bajo las condiciones de operación establecidas.
<b>Método de determinación</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Realizar 10 medidas replicadas de muestras blanco, es decir matrices que no contengan cantidades detectables del analito.</li> <li>• Realizar 10 medidas replicadas de la muestra de ensayo con una baja concentración del analito.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Un analista debe determinar la respuesta de muestras blanco (reactivos, placebos analíticos, etc., según proceda) y la respuesta de muestras analíticas (analito, placebos adicionados, según proceda) en un intervalo de concentraciones del analito que incluya la especificación de la prueba de impurezas límite</li> <li>• Determinar aquella cantidad del analito que genere una respuesta con respecto a la muestra blanco en una proporción de por lo menos de 3 a 1, lo que corresponde a la concentración asociada al límite de detección</li> <li>• Un analista debe hacer una curva de calibración sin incluir el blanco y calcular el valor de la pendiente, el coeficiente de determinación y el intervalo de confianza de la pendiente</li> </ul>
<b>Calculo</b>	$LD = 3xS'_0$ $S'_0 = \frac{S_0}{\sqrt{n}}$ <p>Cuando no hay correcciones por blanco</p> $S'_0 = S_0 \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{1}{nb}}$ <p>Cuando hay correcciones de blanco</p>	$LD = \frac{3.3 \times Sb}{\beta}$

	<p>Donde: n = es el número de réplicas de observación promediadas cuando se informan resultados donde cada réplica es obtenida siguiendo enteramente el procedimiento de medición.</p> <p>nb = es el número de observaciones de blanco promediadas cuando se calcula la corrección del blanco de acuerdo con el procedimiento de medición.</p>	
<b>Criterios de aceptación</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• La estimación del Límite de Detección obtenida durante la validación debería ser tomada como un valor indicativo.</li> <li>• Esto será suficiente si se necesita una estimación del Límite de Detección simplemente para demostrar que las concentraciones de las muestras se encontrarán muy por encima de éste.</li> </ul>	El Límite de Detección debe ser menor a la especificación de la prueba de impurezas límite.

<b>Límite de cuantificación</b>	<b>Documento (1)</b>	<b>Documento (2)</b>
<b>Definición</b>	Es el mínimo nivel de analito que puede ser determinado con desempeño aceptable.	Concentración mínima del analito, que puede ser determinada con precisión y exactitud aceptables, bajo las condiciones de operación establecidas.
<b>Método de determinación</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Realizar 10 medidas replicadas de muestras blanco, es decir matrices que no contengan cantidades detectables del analito.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Un analista debe preparar por lo menos 3 concentraciones de la sustancia de interés (analito, placebos adicionados, etc., según proceda) a valores menores o que incluya la especificación de contenido y/o valoración de la prueba de impurezas, ya sea por dilución o</li> </ul>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>Realizar 10 medidas replicadas de la muestra de ensayo con una baja concentración del analito</li> </ul>	<p>por pesada independiente del analito.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Simultáneamente, preparar por lo menos 5 blancos (reactivos, placebos, etc., según proceda).</li> <li>Medir las respuestas analíticas. Calcular el valor de la pendiente (b), el coeficiente de determinación (<math>r^2</math>) y el intervalo de confianza para la pendiente.</li> <li>Para los blancos, calcular la desviación estándar de los blancos</li> </ul>
<b>Cálculo</b>	$LC = kq \times Sb'$ <p>Donde; El valor del multiplicador kq usualmente es 10, pero se usan comúnmente otros valores como 5 o 6 (basado en criterios de "adecuación al uso").</p>	$LC = \frac{10 \times Sb}{\beta}$
<b>Criterios de aceptación</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>La estimación del límite de cuantificación obtenida durante la validación debería ser tomada como un valor indicativo.</li> <li>Esto será suficiente si se necesita una estimación de Límite de Cuantificación simplemente para demostrar que las concentraciones de las muestras se encontrarán muy por encima del Límite de Cuantificación.</li> <li>En casos donde se espere que las muestras de laboratorio contengan concentraciones bajas del</li> </ul>	<p>El Límite de Cuantificación debe ser menor a la especificación del contenido la valoración de la prueba de impurezas</p>

	analito, el Límite de Cuantificación deberá ser monitoreado regularmente.	
--	---	--

<b>Repetibilidad</b>	<b>Documento (1)</b>	<b>Documento (2)</b>
<b>Definición</b>	Es una medida de la variabilidad en los resultados cuando una medición se lleva a cabo por un solo analista utilizando el mismo equipo en un corto plazo de tiempo.	Precisión de un método analítico, expresada como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas por un solo analista, usando los mismos instrumentos y método.
<b>Método de Determinación</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Medir materiales de referencia, muestras excedentes de ensayo o blancos de muestra adicionados a diversas concentraciones en todo el intervalo de trabajo.</li> <li>• Realizar de 6-15 réplicas para cada material. Con el mismo equipo y analista, mismo laboratorio, corto plazo de tiempo.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Un analista debe preparar el placebo analítico con el tipo de componentes que generalmente están presentes en la muestra. A la cantidad de placebo analítico equivalente a una muestra analítica por sextuplicado, adicionarle la cantidad de analito (puede ser una sustancia de referencia secundaria) correspondiente al 100% de éste en la muestra.</li> <li>• Los placebos adicionados deben ser analizados por un mismo analista bajo las mismas condiciones, utilizando como referencia, la sustancia empleada en la adición al placebo analítico.</li> <li>• Determinar la cantidad recuperada del analito.</li> </ul>



<b>Cálculo</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Determinar la desviación estándar (s) de los resultados para cada material.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Calcular el promedio aritmético (<math>\mu</math>), la desviación estándar (s), el coeficiente de variación (CV) y el intervalo de confianza para la media poblacional del porcentaje de recobro.</li> </ul>
<b>Criterios de aceptación</b>	-----	El Intervalo de Confianza( $\mu$ ) debe incluir el 100% o que el promedio aritmético
		<p>del % de recobro se incluya en el intervalo:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>98 - 102% si el método es cromatográfico,</li> <li>98 - 102% si el método es volumétrico.</li> <li>97 - 103% si el método es químico o espectrofotométrico,</li> <li>95 - 105% si el método es microbiológico</li> </ul> <p>El Coeficiente de Variación del porcentaje de recobro:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>no debe ser mayor de 2% si el método es cromatográfico.</li> <li>no mayor de 2% si el método es volumétrico,</li> <li>no mayor de 3% sí es químico o espectrofotométrico,</li> <li>no mayor del 5% si es microbiológico,</li> <li>no mayor a una magnitud preestablecida, acorde a la especificación del analito en la muestra.</li> </ul>

<b>Precisión Intermedia</b>	<b>Documento (1)</b>	<b>Documento (2)</b>
<b>Definición</b>	Estimación de la variación en los resultados cuando las mediciones se realizan en un solo laboratorio, pero en condiciones que son más variables que las condiciones de repetibilidad.	Precisión de un método analítico, expresada como la concordancia relativa obtenida entre determinaciones independientes realizadas en un mismo laboratorio, por diferentes analistas, en distintos días.
<b>Método de Determinación</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Medir materiales de referencia (MR), muestras excedentes de ensayo o blancos de muestra adicionados a diversas concentraciones en todo el intervalo de trabajo.</li> <li>• Medir de 6-15 réplicas para cada material por analistas y equipos diferentes, mismo laboratorio, plazo prolongado de tiempo.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Analizar por triplicado una muestra homogénea del producto que tenga un nivel cercano o igual al 100 % (en el caso de contenido, potencial valoración) o una muestra homogénea cuyo contenido esté incluido en el intervalo lineal de concentración de linealidad de método (para el caso de impurezas), en dos días diferentes y por dos analistas diferentes.</li> <li>• Utilizar de preferencia la misma sustancia de referencia y los mismos instrumentos y/o equipos.</li> <li>• Reportar el contenido, potencia o valoración del analito de todas las muestras.</li> </ul>
<b>Cálculo</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Determinar la desviación estándar (s) de los resultados para cada material.</li> <li>• Calcular la desviación estándar de repetibilidad de los resultados de ANOVA para cada material. Calcular la desviación estándar entre grupos de los resultados de ANOVA y combinarla con la desviación</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Calcular la media aritmética (<math>\mu</math>), desviación estándar (s) y coeficiente de variación (CV) del contenido, potencia, valoración, empleando todos los resultados obtenidos</li> </ul>

	estándar de repetibilidad para cada material.	
<b>Crterios de aceptación</b>	-----	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Coeficiente de Variación <math>\leq</math> 2% para métodos cromatográficos y volumétricos.</li> <li>• Coeficiente de Variación <math>\leq</math> 3% para métodos químicos o espectrofotométricos.</li> <li>• Coeficiente de Variación <math>\leq</math> 5% para métodos biológicos</li> </ul>

<b>Veracidad (Exactitud para el caso de la guía QFB's)</b>	<b>Documento (1)</b>	<b>Documento (2)</b>
<b>Definición</b>	Expresión de la proximidad de la media de un número infinito de resultados (producidos con el método) a un valor de referencia. Esta evaluación se expresa cuantitativamente en términos de 'sesgo'.	Concordancia entre un valor obtenido empleando el método y el valor de referencia.
<b>Método de Determinación</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Medir 10 veces un Material de Referencia utilizando el método candidato.</li> <li>• Medir 10 veces blancos de matriz o muestras de ensayo no adicionadas y 10 veces adicionadas con el analito de</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Un analista debe preparar el placebo analítico con el tipo de componentes que generalmente están presentes en la muestra.</li> </ul>

	<p>interés en un intervalo de concentraciones.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Medir 10 veces el Material de Referencia o la muestra de ensayo utilizando el método candidato y el método alternativo.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• A la cantidad de placebo analítico equivalente a una muestra analítica por sextuplicado, adicionarle la cantidad de analito (puede ser una sustancia de referencia secundaria) correspondiente al 100% de éste en la muestra.</li> <li>• Los placebos adicionados deben ser analizados por un mismo analista bajo las mismas condiciones, utilizando como referencia, la sustancia empleada en la adición al placebo analítico.</li> <li>• Determinar la cantidad recuperada del analito.</li> </ul>
<p><b>Cálculo</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Comparar el valor medio, con el valor de referencia para el MR. Calcular el sesgo, b, el sesgo relativo en porcentaje, b (%) o la recuperación relativa en porcentaje (recuperación aparente).</li> </ul> $b = \bar{x} - x_{ref}$ $b(\%) = \frac{\bar{x} - x_{ref}}{x_{ref}} \times 100$ $R(\%) = \frac{\bar{x}}{x_{ref}} \times 100$ <ul style="list-style-type: none"> <li>• Comparar la diferencia entre el valor medio de adiciones y el valor medio, con la concentración añadida x adición. Calcular la recuperación relativa de</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Calcular el porcentaje de recobro de cada placebo analítico o muestra adicionada, al obtener el cociente de la 'cantidad recuperada respecto de la cantidad adicionada expresada en porcentaje.</li> <li>• Calcular el promedio aritmético (<math>\mu</math>), la desviación estándar (s), el coeficiente de variación (CV) y el intervalo de confianza para la media poblacional del porcentaje de recobro.</li> </ul>

	<p>adiciones <math>R'</math> (%) a las diferentes concentraciones:</p> $R'(\%) = \frac{\tilde{x}' - \tilde{x}}{x_{ad}} \times 100$ <ul style="list-style-type: none"> <li>• Medir el MR/muestra de ensayo utilizando el método candidato y el método alternativo</li> </ul> $b = \bar{x} - x_{ref}$ $b(\%) = \frac{\bar{x} - x_{ref}}{x_{ref}} \times 100$ $R(\%) = \frac{\bar{x}}{x_{ref}} \times 100$	
<p><b>Criterios de aceptación</b></p>	<p>Para la mayoría de los propósitos, la aceptabilidad del sesgo debería decidirse sobre la base del sesgo general medido en relación con Material de Referencia, materiales adicionados o métodos de referencia apropiados, tomando en cuenta la precisión del método y cualquier incertidumbre de los valores de referencia, y la exactitud requerida para el uso final.</p>	<p>El Intervalo de Confianza (<math>\mu</math>) debe incluir el 100% o que el promedio aritmético del % de recobro se incluya en el intervalo:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 98 - 102% si el método es cromatográfico,</li> <li>• 98 - 102% si el método es volumétrico.</li> <li>• 97 - 103% si el método es químico o espectrofotométrico,</li> <li>• 95 - 105% si el método es microbiológico,</li> </ul> <p>El Coeficiente de Variación del porcentaje de recobro:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• no debe ser mayor de 2% si el método es cromatográfico.</li> <li>• no mayor de 2% si el método es volumétrico,</li> </ul>

		<ul style="list-style-type: none"> <li>• no mayor de 3% si es químico o espectrofotométrico,</li> <li>• no mayor del 5% si es microbiológico,</li> <li>• no mayor a una magnitud preestablecida, acorde a la especificación del analito en la muestra.</li> </ul>
--	--	---

<b>Intervalo de trabajo e intervalo de trabajo lineal (linealidad del sistema en caso de la guía QFB's)</b>	<b>Documento (1)</b>	<b>Documento (2)</b>
<b>Definición</b>	Es el intervalo en el cual el método proporciona resultados con una incertidumbre aceptable. El extremo inferior del intervalo de trabajo está determinado por el límite de cuantificación. El extremo superior del intervalo de trabajo está definido por las concentraciones a las cuales se observan anomalías significativas en la sensibilidad analítica.	Concentraciones incluidas entre la concentración superior e inferior del analito (incluyendo estas), para las cuales se ha demostrado que el método analítico es preciso, exacto y lineal.
<b>Métodos de Determinación</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Medir un blanco más patrones de calibración, a 6-10 concentraciones espaciadas uniformemente en el rango de interés.</li> <li>• Medir un blanco más patrones de calibración, 2-3 veces a 6-10 concentraciones</li> </ul>	<b>Linealidad del sistema</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Un analista debe preparar por lo menos por triplicado 5 niveles de concentración (intervalo) de la solución de referencia ya sea por dilución (a partir de una misma solución concentrada) o por pesadas independientes</li> </ul>

	<p>espaciadas uniformemente en el rango lineal.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Calibrar el instrumento de acuerdo con el procedimiento de calibración propuesto. Medir, de acuerdo con el método documentado, un blanco más material de referencia o blancos de muestra adicionados 2-3 veces a 6-10 concentraciones espaciadas uniformemente en el rango de interés.</li> </ul>	<p>(cuando no sea posible prepararlas por dilución).</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• La concentración central debe ser igual a la que se prepara la solución de referencia en el método o en ciertos casos, la concentración que represente el 100% en la muestra procesada para su medición.</li> <li>• El intervalo debe incluir la especificación para el caso de aquellos métodos utilizados para contenido, potencia o valoración.</li> <li>• Medir la respuesta analítica bajo las mismas condiciones de medición, reportarla relación concentración vs respuesta analítica.</li> <li>• El intervalo está en función del propósito del método, y por lo general se expresa como % de la concentración de la solución de referencia o en función del contenido del analito en la muestra procesada para su medición.</li> </ul> <p><b>Linealidad del método</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Un analista debe preparar el placebo analítico con el tipo de componentes que generalmente están presentes en la muestra.</li> <li>• A la cantidad de placebo analítico equivalente a una muestra analítica por triplicado, adicionarle la cantidad de analito (puede ser una sustancia de referencia secundaria) correspondiente al 100% de éste en la muestra.</li> </ul>
--	--	--

		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Seleccionar al menos dos niveles, superior e inferior de la cantidad del analito (intervalo) y preparar el placebo adicionado al menos por triplicado a cada nivel, manteniendo constante la cantidad de placebo analítico en los tres niveles.</li> <li>• Los placebos adicionados deben ser analizados por un mismo analista bajo las mismas condiciones, utilizando como referencia, la sustancia empleada en la adición al placebo analítico.</li> <li>• Determinar la cantidad recuperada del analito.</li> </ul>
<b>Cálculo</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Graficar la respuesta (eje y) en función de la concentración (eje x). Examinar visualmente para identificar el rango lineal aproximado y los límites superior e inferior del intervalo de trabajo del instrumento.</li> <li>• Graficar la respuesta (eje y) en función de la concentración (eje x). Examinar visualmente para determinar valores atípicos que quizá no se reflejen en la regresión. Calcular las estadísticas de regresión apropiadas.</li> <li>• Calcular y graficar los residuales (la diferencia entre el valor observado de y y el valor calculado de y pronosticado por la línea recta, para cada valor de x). La distribución aleatoria de residuales en</li> </ul>	<b>Linealidad del sistema</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Calcular el valor de la pendiente (<math>\beta</math>), la ordenada en el origen (<math>\beta_0</math>) el coeficiente de determinación (<math>r^2</math>) y el intervalo de confianza para la pendiente.</li> </ul> <b>Linealidad del método</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Reportar la relación cantidad adicionada vs cantidad recuperada. Utilizando el método de estimación por mínimos cuadrados, calcular el valor de la pendiente (<math>\beta</math>), la ordenada en el origen (<math>\beta_0</math>), el coeficiente de determinación (<math>r^2</math>), el intervalo de confianza para la pendiente, el intervalo de confianza para la ordenada al origen y el coeficiente de variación de regresión</li> </ul>



	<p>torno a cero confirma la linealidad. Las tendencias sistemáticas indican la no linealidad o un cambio de varianza con el nivel.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Calcular el porcentaje de recobro de cada placebo o muestra adicionados, al obtener el cociente de la cantidad recuperada respecto de la cantidad adicionada expresada en porcentaje.</li> <li>• Calcular el promedio aritmético (<math>\mu</math>), la desviación estándar (<math>s</math>), el coeficiente de variación (CV) y el intervalo de confianza para la media poblacional del porcentaje de recobro.</li> </ul>
<p><b>Criterios de aceptación</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• La primera etapa dará una confirmación visual de si el intervalo de trabajo del instrumento es lineal o no.</li> <li>• La segunda etapa es necesaria para ensayar un intervalo de trabajo, que se considere lineal y especialmente en el que el método utilice una calibración de dos puntos.</li> <li>• La última etapa se requiere para evaluar si el rango propuesto del instrumento y el procedimiento de calibración son aptos para el uso.</li> </ul>	<p><b>Linealidad del sistema</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Coeficiente de determinación <math>r^2 \geq 0.98</math></li> <li>• IC(<math>\beta</math>) no debe incluir el cero</li> </ul> <p><b>Linealidad del método</b></p> <p><b>Cantidad adicionada vs Cantidad recuperada</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Coeficiente de determinación <math>r^2 \geq 0.98</math></li> <li>• Intervalo de Confianza de la pendiente (<math>\beta</math>) = debe incluir la unidad</li> <li>• Intervalo de Confianza de la ordenada al origen (<math>\beta_0</math>) = debe incluir al cero</li> </ul>

		<p>El Coeficiente de Variación del porcentaje de recobro;</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• no debe ser mayor de 2% si el método es cromatográfico</li> <li>• no mayor de 2% si el método es volumétrico</li> <li>• no mayor de 3% si es químico o espectrofotométrico</li> <li>• no mayor del 5% si es microbiológico</li> </ul> <p><b>Porcentaje de recobro</b></p> <p>El Intervalo de Confianza(<math>\mu</math>) debe incluir el 100% o que el promedio aritmético del % de recobro se incluya en el intervalo:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 98 - 102% si el método es cromatográfico</li> <li>• 98 - 102% si el método es volumétrico</li> <li>• 97 - 103% si el método es químico o espectrofotométrico</li> <li>• 95 - 105% si el método es microbiológico.</li> </ul> <p>El Coeficiente de Variación del porcentaje de recobro:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• no debe ser mayor de 2% si el método es cromatográfico</li> <li>• no mayor de 2% si el método es volumétrico</li> <li>• no mayor de 3% si es químico o espectrofotométrico</li> <li>• no mayor del 5% si es microbiológico</li> </ul>
--	--	---

Robustez	Documento (1)	Documento (2)
<b>Definición</b>	Es una medida de la capacidad de un método analítico para permanecer no afectado por pequeñas variaciones premeditadas de los parámetros del método. La robustez proporciona una indicación de la fiabilidad del método durante su uso normal	Capacidad del método analítico de mantener su desempeño al presentarse variaciones pequeñas pero deliberadas, en los parámetros normales de operación del método.
<b>Método de Determinación</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Identificar las variables que podrían tener un efecto significativo en el desempeño del método.</li> <li>• Establecer experimentos (analizando MR o muestras de ensayo) para supervisar el efecto en los resultados de la medida cambiando de forma sistemática las variables.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Se deben establecer aquellos factores instrumentales (temperatura de la columna, presión en la columna, velocidad de flujo, etc.) y/o factores no instrumentales (pH de fases, volúmenes de solventes orgánicos para una extracción, etc.), relacionados al propio método, que se considere críticos.</li> <li>• En cada condición de operación distinta; así como a la condición normal, analizar la misma muestra por lo menos por triplicado.</li> <li>• Reportar el contenido / potencia / valoración del analito para las muestras de condición normal de operación y para la(s) muestra(s) de las otra(s) condición(es) de operación, expresada(s) como %.</li> </ul>
<b>Cálculo</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Determinar el efecto de cada cambio de condición en los resultados de la medida.</li> <li>• Clasificar las variables según el mayor efecto sobre el desempeño del método.</li> <li>• Realizar pruebas de significación para determinar si los efectos observados son</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Calcular la media aritmética de la condición normal de operación (<math>Y_0</math>) y de cada condición de operación diferente a la condición normal (<math>Y_i</math>).</li> <li>• Calcular la diferencia absoluta de la media aritmética de cada condición respecto a la condición normal.</li> </ul>

	estadísticamente significativos.	
<b>Criterios de aceptación</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Diseñar el control de calidad o modificar el método para controlar las variables críticas, por ejemplo, indicando los límites de tolerancia adecuados en el procedimiento operativo estándar.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li><math> diferencia\ absoluta  \leq 2\%</math> para métodos cromatográficos y volumétricos.</li> <li><math> diferencia\ absoluta  \leq 3\%</math> para métodos químicos y espectrofotométricos.</li> <li><math> diferencia\ absoluta  \leq 5\%</math> para métodos biológicos.</li> </ul>

## Discusión de Resultados

### Comparativa Selectividad/Especificidad.

Cuando se habla de Selectividad y Especificidad es muy común confundir ambos términos como sinónimos, sin embargo, la diferencia significativa en ambos es que la especificidad se refiere a la detección de un átomo o molécula en particular, mientras que la selectividad habla sobre la afinidad que hay hacia alguno de ellos, pero siendo aun afectado por la presencia de otras especies. En ambas guías las definiciones son muy similares, pero no así sus criterios de aceptación. Mientras que en la guía del CENAM abogan por desarrollar de nuevo el método cuando la respuesta tiene afectaciones importantes por la presencia de otros átomos o moléculas, en la guía del Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México obligan a que la respuesta sea debida únicamente al analito. En ambas guías es necesario adicionar intencionalmente sustancias que pudiera contener la matriz del analito y medir la respuesta analítica, en la guía del Colegio de QFB's mencionan que se deben considerar los compuestos que pudieran surgir de la descomposición de los analitos algo que no contempla la guía EURACHEM, por otro lado en ésta última se solicita que se debe analizar primeramente un material de referencia, que confirme en primera instancia, que el método es selectivo, en este caso la guía EURACHEM, parece ser más coherente respecto a este parámetro, por último ambas guías no hacen mención al uso de otro método validado y selectivo al analito para comparar el método puesto a prueba.

Conforme se efectúa el método ya sea directamente sobre la muestra o extrayendo el analito, de manera general, una forma de discriminar si un método es selectivo a un analito es midiendo la respuesta analítica de un material de referencia certificado por medio de una curva de calibración con adiciones de estándar o extrayendo el analito e interpolando la respuesta analítica en una curva de calibración, esto, dependiendo del uso final que se le dará al método y el número de muestras que se vayan a analizar. Para el primer caso la adición de interferentes se hace sobre la misma matriz en la cual se encuentra el analito y la respuesta analítica no deberá cambiar en la determinación, en el segundo caso al material de referencia se deberá agregar los interferentes y se

llevará a cabo el proceso de extracción, al medir la respuesta analítica esta no deberá cambiar con respecto a aquella a la cual no se le agregaron interferentes.

La forma de decidir si la matriz afecta en la selectividad del o de los analitos consta en realizar una cuantificación en la matriz y en un placebo analítico preparado con los analitos de interés, al realizar la curva de calibración se obtiene la concentración y la desviación estándar de los resultados, por medio de una prueba F de Fischer para la comparación de desviaciones muestrales y una prueba T de Student para la comparación de resultados a cierto nivel de confianza, no deben existir diferencias entre ambas (Magarelli et al., 2013).

### **Potenciometría**

Para medidas con electrodos selectivos a iones, se considera que existen iones con características similares que pueden afectar la respuesta analítica, por ello será necesario asegurar que no haya presencia de éstos en la muestra, de existir, será necesario demostrar que la contribución es despreciable a través de los coeficientes de selectividad de los iones interferentes por medio de la ecuación de Nicolsky–Eisenman (ec. 2), si el valor del coeficiente de selectividad del ion interferente es mayor a 1 el electrodo es mayormente sensible al ion interferente, de ser 1 es igualmente sensible al ion interferente y al ion de interés, y de ser menor a 1 es menos sensible al ion interferente, se debe justificar por qué se acepta este parámetro (Frag et al., 2020).

$$k_{(A,B)}^{pot} = a_A / (a_B)^{(z_A/z_B)}$$

**Ecuación 2.** Coeficiente de selectividad en función de la actividad del ion de interés y el ion interferente

La forma común de determinar el coeficiente es variando la concentración del ion de interés (3 o más puntos de una gráfica) y manteniendo constante y conocido la actividad del ion interferente ( $a_B$ ), se debe graficar el potencial obtenido en función del logaritmo de la concentración del ion de interés. La intersección de la extrapolación de la recta dará como resultado el logaritmo de la actividad del ion de interés, los coeficientes  $Z_A$  y  $Z_B$  son las cargas absolutas de cada ion.

Para el caso de titulaciones, el parámetro de selectividad se demostrará agregando interferentes y realizando la titulación, no debe haber cambios en el punto de equivalencia en contraste con la titulación sin interferentes.

### **Conductimetría**

En este parámetro se demostrará que no hay contribución a la respuesta analítica (conductividad) por la naturaleza del disolvente. Debido a que esta técnica es muy sensible a la presencia de iones en el medio donde se lleva a cabo la medición, se induce que la adición de cualquier interferente que se disuelva y genere iones en el medio provocará un cambio en la respuesta analítica; será necesario demostrar que el medio, en este caso el disolvente no tenga injerencia en la medición de conductividad, para ello se simulará la adición de un interferente, añadiendo más disolvente al medio donde se está realizando la medición de conductividad, esta adición no debe generar medidas distintas a la medición de inicial de conductividad (Umarov et al., 2020).

### **Voltamperometría**

Los potenciales de oxidación o reducción del analito no deberán ser alterados por la adición de posibles interferentes y/o pruebas de sometimiento de estrés, no debe haber cambios como achatamiento de pico o desplazamientos de potencial. Si el objetivo es cualificar o cuantificar la totalidad de ciertos tipos de analitos con potenciales similares, se tendrá que demostrar que su contribución a la cantidad de corriente producida es proporcional a la cantidad total de ellos (Hoyos Arbeláez et al., 2017).

### **Cromatografía**

El pico asociado con el analito no deberá ser modificado por la presencia de interferentes y tampoco por el sometimiento a estrés de la muestra. Un parámetro de aceptabilidad consiste en que el pico posea una resolución mínima de 1.5 con relación a los picos adyacentes de acuerdo con la ecuación 3. Cualquier otro valor deberá ser justificado.

$$RS = \frac{2[(t_r)_B - (t_r)_A]}{W_B + W_A}$$

**Ecuación 3.** Resolución de dos picos adyacentes donde  $t_{rB}$  es el tiempo de retención del pico con mayor tiempo de retención y  $W_{B,A}$  son el ancho de cada pico

Para mejorar la selectividad se necesita optimizar la polaridad de la mezcla de disolventes para el caso de cromatografía de líquidos y seleccionar la columna adecuada para el tipo de compuesto que se necesita cuantificar.

### **Espectroscopia UV-Visible**

La adición de interferentes no deberá afectar la región de cuantificación del analito, esto se traduce en que la absorbancia del pico referente al analito no sea aumentada o disminuida por la presencia de otros compuestos. En el caso de que las sustancias presentes muestren afectaciones en el pico de interés se puede recurrir a derivar el espectro en función de la longitud de onda, de esta manera las contribuciones pueden separarse o hasta eliminarse. La cuantificación del analito seguirá la misma ley de Lambert-Beer con los espectros de derivadas (Alhogbi, 2017).

### **Espectroscopia de Absorción atómica**

Debido a que se fabrican lámparas específicas para cada elemento es de esperarse que su detección sea altamente selectiva cuando se encuentre aislada de otros elementos, pero en realidad, las líneas espectrales tienden a sobreponerse en presencia de otros átomos metálicos o compuestos orgánicos, por tanto es necesario llevar a cabo la comprobación de este parámetro con material de referencia, para asegurar que la línea espectral seleccionada no se encuentre aumentada o disminuida por los elementos de la muestra por medio de la cuantificación del analito. En caso de estar afectada, puede seleccionarse otra línea espectral del mismo elemento (Sulthoniyah et al., 2018), tomando en cuenta que las líneas seleccionadas afectarán otros parámetros de validación como el límite de detección/cuantificación y el rango lineal.

## **Emisión atómica. ICP-OES**

Debido a que esta técnica aprovecha las líneas producidas por los elementos en estado ionizado, sólo se comprobará que las líneas seleccionadas del analito no se vean afectadas por otras de elementos presentes, de ser así se pueden elegir otras líneas o cambiar la posición de la antorcha de manera axial o radial (Lopez et al., 2011).

### **ICP-Masas**

Para esta técnica es común encontrar interferencias isobáricas, es decir, compuestos poliatómicos cargados que poseen la misma masa atómica que el ion de interés, estos compuestos tienen distintos orígenes, el más común es por la composición de la matriz, es decir, los compuestos presentes además del analito. La forma de eliminar estas interferencias es por medio de celdas de colisión por las cuales se hace pasar un gas altamente reactivo como Oxígeno, Hidrogeno, Amoniacó o inerte como Argón, los iones y compuestos productos de la ionización en la antorcha de plasma impactan este gas lo cual favorece la destrucción de los compuestos interferentes o la formación de otros compuestos poliatómicos con masa distinta al ion de interés (Kutscher et al., 2017).

## **Comparativa Límite de Detección**

Para entender este concepto es necesario definir con qué fin se dispone. El límite de detección es la concentración mínima de analito que puede detectarse con el método sin llegar a confundirse con el ruido de fondo producido por el instrumento con un error aceptable (~5%), en ambas guías esta definición es similar, lo cual no tiene ningún aspecto discutible, esto puede utilizarse con la finalidad de decidir si existe el analito o si alguna impureza se encuentra en la muestra. El trasfondo de ello radica en el intervalo de valores de señal analítica producido por el instrumento cuando no se tiene presencia del analito, en yuxtaposición con el rango de concentraciones en las cuales el analito produce una señal. Para comparar ambas características se necesitan reducir los errores tipo 1, señales que conforman los falsos positivos y errores tipo 2, producidos por los falsos negativos asumiendo que ambas características siguen una distribución normal.

En ambas guías se utiliza la desviación estándar producida por el ruido de fondo en función de la concentración determinada por la curva de calibración a utilizar, en la guía QFB's son más claros en este aspecto debido a que utilizan la desviación estándar de la ordenada al origen cuyo significado es la concentración asociada cuando la señal del instrumento es nula y la pendiente de la recta que se utilizará en la aplicación del método, el límite de detección tendrá entonces unidades de concentración. En la guía de la EURACHEM este valor de desviación estándar se asocia con los valores de concentración medidos a partir de una muestra sin analito o con una concentración mínima de analito adicionada y determinado su valor por medio de una regresión lineal, en este aspecto la guía es ambigua respecto al cálculo, la desviación estándar asociada corresponde a la cantidad medida de analito a un nivel mínimo de concentración.

En la guía QFB's como en la guía EURACHEM se utilizan los criterios de la IUPAC de 1987 para la determinación del límite de detección, siendo 3 el factor de cobertura para el 99.75% y 3.3 el 99.90% de los valores debido al ruido de fondo del instrumento. Estos valores por simplicidad se ocupan asumiendo que la distribución de los valores es normal y el número de mediciones acapara la normalidad de la distribución, pero estos valores resultan arriesgados para pruebas como el límite de impurezas, ya que si estas mediciones no siguen una distribución normal solo se asegura que hay una probabilidad del ~87% de que la medición no sea confundida con el ruido de fondo (Long & Winefordner, 1983). Una forma alternativa de obtener este valor es utilizando las reglas de la IUPAC de 1997 sin tener en cuenta los errores asociados a la recta de calibrado (ecuación 4) o tomando en cuenta los errores asociados a la recta de calibrado (ecuación 5), la ventaja que representa el uso de estas ecuaciones es que engloba con una mayor certeza las mediciones límite de los analitos (*Análisis Instrumental Métodos de Estimación de Límite de Detección y Límite de Cuantificación En Metodologías Instrumentales*, 1993).

$$LD = \frac{2 * t_{(t-\alpha, \nu)} * S_0}{\beta}$$

**Ecuación 4.** Límite de detección en función de la distribución T de Student, solo tomando en cuenta la desviación producida por el número de mediciones.

$$LD = \frac{2 * t_{(t-\alpha, \nu)} * [S_0^2 + S_a^2 + (a/b)^2 * S_b^2]^{1/2}}{\beta}$$

**Ecuación 5.** Límite de detección en función de la distribución T de Student tomando en cuenta todas las contribuciones de desviaciones por la recta de calibrado.

Para monitorear este parámetro de acuerdo con el tipo de validación que se requiera, se puede recurrir al límite de detección del método (MDL) y posteriormente pasar al límite de detección (LD), el primero se define como la concentración mínima de un analito que, en una matriz dada y con un método determinado, tiene una probabilidad del 99% de ser identificado, determinado cualitativamente, e informado como mayor que cero. De ello se desprende una concentración que el analista considere como el límite de detección, al hacer varias mediciones (7 al menos) y obteniendo su desviación estándar pueda obtener el límite de detección del método (ec.6).

$$MDL = s * t_{(n-1, 1-\alpha)}$$

**Ecuación 6.** Límite de detección del método asumiendo una desviación estándar constante al nivel de concentración del analito establecido.

Posteriormente el límite de detección se obtiene a partir del límite de detección el método (ec.7). Es de destacar que se trata de un límite muy realista, ya que considera la medición real de concentraciones próximas al Límite de detección (USEPA, 2016).



$$LD = 3.18 * MDL$$

**Ecuación 7.** Límite de detección obtenido a partir del Límite de detección del método

De acuerdo con el uso del método este valor puede ser solo como un justificante del parámetro, mientras que, en el otro extremo, cuando se apliquen pruebas de impurezas o presencia de analito, éste deberá ser riguroso en cuanto a los factores utilizados para su determinación.

Cabe señalar, que a menos que los métodos se ejecuten por volumetrías (titulaciones), el límite de detección se determinara a través de la curva de calibración, esto engloba a las técnicas potenciométricas, cromatográficas, voltamperometrías y las espectroscopias. Para el caso de las titulaciones se tendrá que determinar por medio de la examinación visual agregando pequeñas cantidades de analito y observando los cambios en alguna propiedad como el color, por ejemplo, para las titulaciones complejométricas (Reutemann & Huber, 2003).

### **Comparativa Limite de Cuantificación**

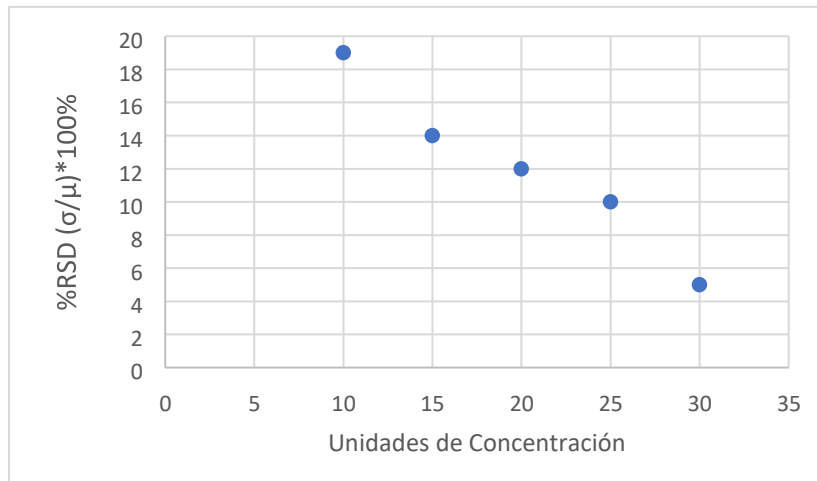
El límite de cuantificación se describe como la concentración mínima de analito que puede ser determinado con cierto nivel de veracidad y precisión, tanto en la guía EURACHEM como la Guía de QFB's estas definiciones no precisan que niveles de desempeño deben tener exactamente, lo común es que el coeficiente de variación máximo sea de 10%, es decir, que la cantidad de analito medida justo en el límite de cuantificación tenga una desviación estándar de la décima parte de la concentración establecida. Este parámetro tiene la cualidad de demostrar; hasta que concentración es capaz de medir el instrumento y el límite inferior de una curva de calibración que se puede hacer en las condiciones del experimento de validación. Ambas guías presentan los cálculos iguales [ec. 8] , pero para este caso la guía EURACHEM es más rigurosa en cuanto al número de mediciones que deben hacerse, en este caso 10, no pareciendo suficientes 3 para el caso de la guía QFB's. Cada una de ellas argumenta la necesidad que tenga el analista para su determinación, si las concentraciones a determinar se ubican cerca de este límite, se debe cerciorar continuamente como menciona la guía EURACHEM, mientras que en la guía QFB's solo se debe cerciorar que el límite de cuantificación debe ser inferior a la especificación del contenido de impurezas límite para lo cual no todos los instrumentos poseen esa capacidad de detección.

$$LC = \frac{10 * Sb}{\beta}$$

**Ecuación 8.** Cálculo para obtener el límite de cuantificación en función de la desviación estándar del blanco y la pendiente de la recta de calibrado a utilizar

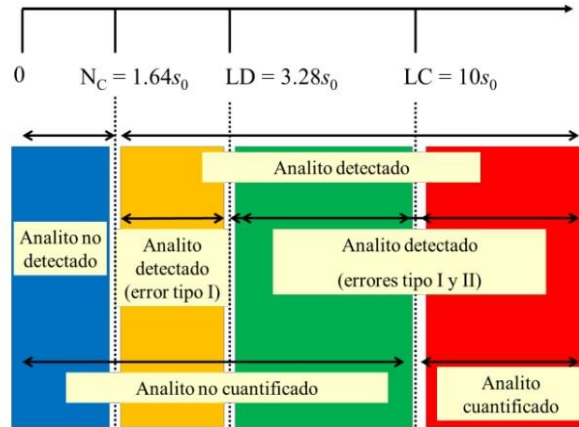
### Límite de cuantificación basado en la desviación standard relativa (RSD) de la señal.

Para los casos donde sea necesario monitorear continuamente esos niveles de concentración, se puede recurrir a utilizar la desviación estándar relativa graficando esta en función de la concentración medida, menor concentración igual a mayor incertidumbre y por lo tanto mayor desviación estándar relativa, y a partir de ello elegir como máximo el 5% o el 10% (dependiendo de la precisión que se requiera) e interpolar en la gráfica obtenida (Gráfica 1).



**Gráfica 1.** Ejemplo de gráfico donde se inspecciona visualmente el límite de cuantificación en función de la desviación estándar relativa, a menor concentración mayor desviación estándar relativa.

Similar al límite de detección, este parámetro solo requiere de datos como la pendiente de la recta para las técnicas referentes al uso de rectas de calibrado, para las volumetrías (titulaciones) se requiere utilizar el gráfico de desviación estándar relativa y elegir el nivel requerido para la validación del método.



**Figura 1.** Representación gráfica de los límites de detección y cuantificación, donde se aprecia visualmente la diferencia del límite de cuantificación con el límite de detección, ambos están en función de la desviación estándar del blanco y del tipo de error que se comete al realizar el proceso de medición

### Comparativa Repetibilidad.

Este parámetro tiene como fin medir que tanto varía el método de acuerdo con un solo operario e instrumento, cuyos resultados arrojan la capacidad del analista para llevar a cabo el proceso de medición y la calidad del instrumento que efectúa las mediciones, es decir, que para que la medición se lleve a cabo de manera correcta se debe medir una cantidad bien establecida de analito. Las definiciones de ambas guías no distan una de la otra al igual que el método de determinación. El criterio de aceptación de la guía QFB's menciona que el intervalo de confianza debe contener el 100% dando un rango entre 2% y 5% de este intervalo, en este aspecto esta guía cumple de una manera más satisfactoria como debe realizarse la validación, ya que este parámetro asegura que ambos, el analista y el instrumento, está realizando de manera correcta el proceso de medición tomando en cuenta todos los errores producidos durante el proceso de medición (ec. 9).

$$IC(\mu) = \mu \pm \frac{t_{(0.975, n-1)}}{\sqrt{n}} * S_0$$

**Ecuación 9.** Intervalo de confianza en función del número de mediciones y el promedio aritmético de la muestra analizada, el intervalo de confianza no debe rebasar más del 5% respecto al promedio.

El proceso de medición debe llevarse a cabo por lo menos 6 veces como indican ambas guías, realizando desde el pretratamiento de la muestra, el tratamiento y el análisis de ésta; esto aplica para todas las técnicas y los distintos modos de determinación. Una manera de asegurar este parámetro es medir un número grande de muestras.

## **Comparativa Precisión Intermedia**

La precisión intermedia involucra medir distintas muestras por distintos analistas, en diferentes equipos y en distintos días con la finalidad de medir la variabilidad de los resultados en el laboratorio. A diferencia de la repetibilidad, este parámetro busca controlar dichos factores. En ambas guías los procedimientos a realizar son prácticamente iguales, el tratamiento de resultados en la guía QFB's busca homogenizar todos los resultados haciendo un análisis similar al de repetibilidad, obteniendo los promedios, desviaciones y coeficientes de variación de los resultados obtenidos; en el caso de la guía del CENAM, se busca por medio de las varianzas y un análisis ANOVA los causantes de dichas variaciones en los resultados con el fin de mantenerlos bajo control. Para este parámetro la que mejor responde a las necesidades es la guía EURACHEM.

Para todas las técnicas el procedimiento total de medida debe llevarse a cabo tal cual mencionan las guías, cambiando equipos, analistas y en diferentes días, esto conlleva a determinar la influencia de: las condiciones ambientales, los analistas y los equipos, es decir contribuciones únicamente debidas al error aleatorio dentro de un laboratorio (Peters et al., 2007).

## **Comparativa Veracidad (Exactitud para la guía QFB's)**

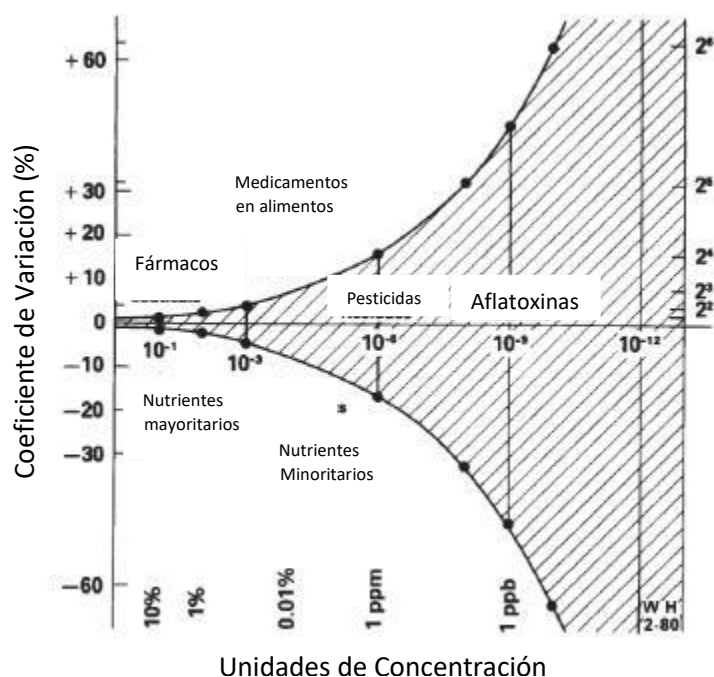
La veracidad de un método analítico es el grado de concordancia entre un valor obtenido promedio hecho a través de una serie de mediciones y un valor el cual se considera verdadero o de referencia, el cual puede ser representado en términos de recobro o de sesgo sea absoluto o relativo (Hubert et al., 2007). Existen por lo menos 3 métodos de determinación para obtener dicho parámetro, como lo indica todas las definiciones, éste debe coincidir con un valor aceptado como verdadero. El primer método consiste en medir un material de referencia certificado que permita comparar el valor obtenido, el segundo consiste en crear placebos analíticos y comparar la cantidad recuperada contra la cantidad real, y el último de ellos consiste en comparar la medición del método con uno que se encuentre validado. La guía EURACHEM contempla todos estos métodos, mientras que la guía QFB's solo apela a uno de ellos. De esto se sigue con el número de pruebas adecuadas que deben realizarse, mientras que en la guía EURACHEM se pide como requisito mínimo el hacer 10 pruebas, en la guía QFB's solo se solicitan 6. En este aspecto se consideran dos factores: el tiempo y recursos que se utilizarán en la validación y el error que se esté dispuesto a cometer; a mayor número de pruebas se prevé que el resultado será más veraz, porque se disminuye la influencia de los errores de medición y a menor número de pruebas este error se hará más evidente pero la cantidad de recursos utilizados será menor.

Típicamente para todas las técnicas el procedimiento consiste en medir a través del método el recobro por medio de adiciones dentro del intervalo de trabajo del método y el sesgo comparando la medición per se con un material de referencia certificado, pero ninguna de las dos guías hace hincapié en la precisión del método en función de la cantidad de analito que será medida. Para esta faceta, el analista puede encontrarse que en muestras con un contenido grande de analito su

respectivo intervalo de confianza es relativamente corto, pero concentraciones más pequeñas se hace evidente que el intervalo de confianza será más grande por el crecimiento de la incertidumbre, por lo que una buena referencia para decidir que tanto se está dispuesto a aceptar en este parámetro es la ecuación de Horwitz (ec. 10). Esta se estableció en un estudio inter-laboratorio llevado a cabo en los años 80's en la determinación de diferentes compuestos en matrices distintas, la ecuación resultado permite correlacionar el coeficiente de variación con la concentración del analito (Rivera & Rodriguez, 2010). Gracias a esto podemos estimar no solo el coeficiente de variación, útil para pruebas de reproducibilidad, sino también el intervalo de confianza en función de la cantidad de analito esperado durante una validación (Tabla 2).

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

**Ecuación 10.** Ecuación del coeficiente de variación en función de la concentración del analito.



**Figura 2.** Trompeta de Horwitz donde se representa el crecimiento del coeficiente de variación en función de la concentración (editada). En *HORWITZ EQUATION AS QUALITY BENCHMARK IN ISO/IEC 17025 TESTING LABORATORY*, por Carlos Rivera, Rosario Rodríguez [2010]

Analito (%)	Fracción de Analito	Unidades de Concentración	Intervalo de confianza de recuperación
100	1	100%	98–102
10	10 <sup>-1</sup>	10%	98–102
1	10 <sup>-2</sup>	1%	97–103
0.1	10 <sup>-3</sup>	0.1%	95–105
0.01	10 <sup>-4</sup>	100 ppm	90–107
0.001	10 <sup>-5</sup>	10 ppm	80–110
0.0001	10 <sup>-6</sup>	1 ppm	80–110
0.00001	10 <sup>-7</sup>	100 ppb	80–110
0.000001	10 <sup>-8</sup>	10 ppb	60–115
0.0000001	10 <sup>-9</sup>	1 ppb	40–120

**Tabla 2.** Intervalo de confianza de recuperación de analito en función de la cantidad de analito (editada). En *Intra-laboratory assessment of method accuracy (trueness and precision) by using validation standards*, por A. Gustavo González [2010]

### Comparativo intervalo de trabajo lineal y linealidad del sistema y método

El intervalo de trabajo o linealidad es el rango de concentraciones para el cual el método es lineal, veraz y lo suficientemente preciso para efectuar la medición del analito y éste se limita en los extremos por el límite de detección y la concentración máxima a la cual se observan anomalías en la linealidad de la curva de calibración, es decir, deja de ser lineal (Araujo, 2009). Para demostrar este parámetro es imperativo decidir qué cantidad de analito se espera en o las muestras y el número de muestras que se van a procesar, con el fin de disminuir el trabajo al realizar posteriores curvas de calibración con 2 o más puntos y ampliar el alcance de concentraciones para las cuales el método funciona, cuando la concentración del analito no corresponda al punto central de la curva.

Ambas guías contemplan el hecho de que se necesitan al menos 5 concentraciones uniformemente espaciadas, y que el punto central deba coincidir con el 100% del contenido de analito en la muestra. La guía QFB's considera dos parámetros de linealidad, el primero es la linealidad del sistema y el segundo es la linealidad del método. El primero tiene como fin demostrar que la recta de calibrado funciona para el propósito del método, es decir, que la cantidad de analito a determinar es correctamente cuantificada bajo las condiciones de la recta de calibrado, el segundo tiene como fin determinar el rango de concentraciones en las cuales el método se comporta de manera lineal sin sufrir anomalías. Por otro lado, la guía EURACHEM sigue una serie de pasos, los cuales en síntesis son: demostrar un rango de concentraciones que siguen una tendencia lineal, y teniendo ese estimando, obtener un rango de concentraciones para las cuales se cumpla la linealidad y sirva para la cuantificación del analito, por último, obtener los parámetros de calibración del instrumento, de tal forma que se puede asegurar que el instrumento es apto para el uso del método y extrapolar el uso de otros instrumentos para saber cuáles instrumentos pueden utilizarse. Estas dos guías hacen uso de los gráficos de residuales y del coeficiente de correlación ( $r^2$ ) para

determinar la linealidad, pero como tal no existe una prueba  $r^2$  que discierna entre una línea con valor  $r^2=0.999$  u otra con  $r^2=0.997$ , esto es, que mida cuantitativamente el grado de linealidad; de igual manera, muchas veces resulta confuso entender el gráfico de residuales viendo patrones donde no existen, por ello existe una tercera opción, la cual recurre a una prueba F de Fisher, compara los errores de las sumas de los cuadrados de las respuestas analíticas experimentales y las respuestas analíticas teóricas (ecs. 11-19)

$$SS_r = \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^{J_i} (y_{ij} - \hat{y}_i)^2 \quad \text{(Ecuación 11)}$$

$$SS_{\varepsilon} = \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^{J_i} (y_{ij} - \bar{y}_i)^2 \quad \text{(Ecuación 12)}$$

$$SS_{lof} = \sum_{i=1}^I (\bar{y}_i - \hat{y}_i)^2 \quad \text{(Ecuación 13)}$$

Residuales de la suma de errores, suma de errores experimentales, suma de errores para el propósito, donde el termino  $y_{ij}$  representa la respuesta experimental,  $\hat{y}$  la respuesta analítica estimada basada en la curva de calibración,  $\bar{y}$  el promedio de la respuesta analítica.

Los grados de libertad asociado a las ecuaciones son respectivamente:

$$GL_r = (IJ - 2) \quad \text{(Ecuación 14)}$$

$$GL_{\varepsilon} = (IJ - I) \quad \text{(Ecuación 15)}$$

$$GL_{lof} = (I - 2) \quad \text{(Ecuación 16)}$$

Donde IJ son los números de mediciones por el número de repeticiones de cada una, I el número de mediciones.

Y la forma de obtener las varianzas al igual que el valor de prueba F son:

$$\sigma_{lof}^2 = \frac{SS_{lof}}{GL_{lof}} \quad \text{(Ecuación 17)}$$

$$\sigma_{\varepsilon}^2 = \frac{SS_{\varepsilon}}{GL_{\varepsilon}} \quad \text{(Ecuación 18)}$$

$$F_{(I-2)/(IJ-1)} = \frac{\sigma_{lof}^2}{\sigma_{\epsilon}^2} \quad \text{(Ecuación 19)}$$

Utilizando esta prueba se puede discriminar que tan aparente es una línea recta, es decir, aunque el valor de su coeficiente de correlación sea cercano a 1, cuando el valor de la F calculada sea menor al valor de la F obtenida a través de las tablas F de Fisher, se puede asegurar que cumple con la linealidad en el rango de concentraciones propuesto. Cuando esto no se cumple se debe reducir el rango de concentraciones para asegurar la linealidad.

Para todas las técnicas analíticas la forma de demostrar este parámetro es determinando el rango de concentraciones empezando por 3 disoluciones igualmente espaciadas en el rango de interés del método y una vez definido este rango aumentar el número de disoluciones igualmente espaciadas. Puesto que éste es el factor con más variabilidad debido al funcionamiento particular de cada uno de los instrumentos utilizados, es imperativo probar la linealidad para cada instrumento sobre el cual se ejecutará el método dado que no solo las condiciones ambientales y destreza del analista afectará la medición, sino las mismas especificaciones del fabricante del instrumento.

## Comparativa Robustez

El parámetro de robustez de un método se refiere a la capacidad de un método para ser reproducido obteniendo los mismos resultados contemplando grandes variaciones como el uso de diferentes equipos y la aplicación de distintos analistas, así como de pequeñas variaciones. El objetivo principal de este parámetro es la determinación de aquellos factores críticos que afectan las mediciones, para ello, se seleccionan y exageran deliberadamente los factores fuera de los valores contemplados que puedan ocurrir durante la aplicación del método. La serie de pasos que pueden ser identificados en la prueba de este parámetro son: (a) la identificación de los factores que pueden ser alterados y pueden afectar al método; (b) definir los niveles en los cuales se afectaran estos factores; (c) diseñar los experimentos a llevar a cabo; (d) definir el protocolo experimental; (e) ejecutar los experimentos y evaluar las respuestas del método; (f) calcular el efecto que produce cada factor en la respuesta analítica; (g) análisis estadístico de cada efecto; (h) concluir la incidencia de cada efecto, su impacto y rango de operación para llevar a cabo el método, asegurando calidad en la medición. La selección de los factores debe ser en función del procedimiento operacional del método, estos pueden ser cuantitativos (continuos) o cualitativos (discretos) o la combinación de ambos (Vander Heyden et al., 2001).

A continuación, se presentan una serie de factores de acuerdo con el tipo de técnica analítica que pueden ser alterados, en cada uno de estos se espera un impacto en el resultado del análisis, cada serie de factores es exclusivo de cada técnica por lo cual se agruparon del lado derecho de la tabla. El orden de las técnicas es: (1) Cromatografía de Líquidos; (2) Cromatografía de Gases; (3) Conductimetría; (4) Potenciometría; (5) Voltamperometría; (6) Espectroscopia Ultravioleta Visible; (7) Espectroscopia de Absorción atómica; (8) Espectroscopia de Emisión Atómica.



<i>Método</i>	<i>Factores</i>
Cromatografía de líquidos	pH de la fase móvil
	Pretratamiento de la muestra
	Concentración de buffer, concentración de sales o fuerza iónica
	Velocidad de flujo
	Temperatura de la Columna
	Para el gradiente de elución:
	Composición inicial de la fase
	Composición final de la fase
	Cambio en el gradiente de elución
	Para la columna:
	Tipo de fase estacionaria
	Fabricante de la fase estacionaria
	Tiempo de vida de la columna
	Factores del detector:
	Longitud de onda
	Voltaje (detectores electroquímicos)
Factores de Integración:	
Sensibilidad del equipo	

**Tabla 3. Factores variacionales del método, cromatografía de líquidos**

Cromatografía de gases	Temperatura de Inyección
	Temperatura de la columna
	Temperatura de detección
	Para el programa de temperaturas:
	Temperatura inicial
	Temperatura final
	Velocidad del gradiente de temperatura
	Flujo del gas acarreador
	Para el programa del gas acarreador
	Flujo inicial
	Flujo final
	Velocidad de gradiente del flujo del gas

Tipo de columna
Longitud de la columna
Factores de la columna:
Tipo de fase estacionaria
Fabricante de la fase estacionaria
Tiempo de vida de la columna

**Tabla 4. Factores variacionales del método, cromatografía de gases**

<i>Conductimetría</i>	Composición de disolventes
	Pretratamiento de la muestra
	Concentración del analito
	Concentración del reactivo titulante
	Temperatura del disolvente
	Características de la celda
	Tipo de celda
	Fabricante de celda

**Tabla 5. Factores variacionales del método, Conductimetría**

<i>Potenciometría</i>	Composición de disolventes
	Pretratamiento de la muestra
	Efecto de la Temperatura
	Efecto del pH
	Efecto de cationes y aniones presentes
	Tipo de electrodo de trabajo
	Concentración del reactivo titulante
	Concentración del analito

**Tabla 6. Factores variacionales del método, potenciometría**

<i>Voltamperometría</i>	Pretratamiento de la muestra
	Tipo de electrodo de trabajo
	Tipo de disolvente
	Concentración del buffer
	Programa de perturbación
	Concentración del analito
	Efecto del pH
	Efecto de la Temperatura
	Concentración del reactivo titulante

**Tabla 7. Factores variacionales del método, voltamperometría**

Espectroscopia ultravioleta visible	Disolvente o composición de disolventes
	Pretratamiento de la muestra
	Características de la celda
	Material de la celda
	Longitud de la celda
	Anchura de la rendija
	Características de la lampara
	Tipo de lampara
	Fabricante de la lampara
	Características de la disolución
	Concentración de la disolución
	pH de la disolución
	Viscosidad de la disolución
	Composición de la disolución
	Concentración de buffer

**Tabla 8. Factores variacionales del método, Espectroscopia ultravioleta visible**

Espectroscopia de Absorción atómica	Características de la lámpara
	Tipo de lámpara
	Fabricante de la lámpara
	Características del nebulizador
	Tipo de nebulizador
	Fabricante del nebulizador

Tipo de sistema de deflexión del flujo
Composición de los gases de la llama
Tipo de cabeza del quemador
Programa de temperatura (horno de grafito)
Selección de la longitud de onda
Ancho de la rendija
Pretratamiento de la muestra

**Tabla 9. Factores variacionales del método, absorción atómica**

Emisión atómica	Tipo de nebulizador
	Tipo de cámara de aerosol
	Configuración axial o radial de la antorcha
	Flujo de Argón
	Flujo del gas auxiliar
	Velocidad de la bomba
	Selección de longitud de onda
	Pretratamiento de la muestra

**Tabla 10. Factores variacionales del método, emisión atómica**

Ambas guías remarcan la idea de variar cada factor que influye al final de la medición y de esta forma evaluar cuales son las condiciones óptimas para la realización del experimento, con el fin de clasificar y delimitar las variables críticas. El efecto de cada factor está relacionado con el objetivo del método, ¿vale la pena evaluar todos los factores? ¿Existen factores que tengan relación entre ellos? ¿Cuántos factores serán evaluados? La justificación de ambas guías, aunque sea el demostrar las condiciones óptimas de análisis no toman en cuenta los recursos del laboratorio ni el tiempo necesario para llevar a cabo todos los experimentos. Por ello se puede recurrir a un diseño de experimentos que pueda definir los variables críticas en el menor número de experimentos.

Por un lado, cuando los factores a evaluar son pocos lo ideal es efectuar un diseño factorial de dos bloques alternando la totalidad de combinaciones posibles para un experimento, usando dos niveles, uno inferior y otro superior al valor establecido para el método; sin embargo, este diseño presenta la desventaja de que el número de experimentos se dispara cuando existen 4 o más factores a evaluar siendo  $2^k$  con k igual al número de factores, para ello existen alternativas como un diseño factorial de dos bloques fraccionado, o un diseño Placket-Burman, los cuales tienen la ventaja de reducir el número de experimentos cuando el número de factores a evaluar es elevado, pero estos últimos presentan la desventaja, de no tomar en cuenta las interacciones entre los factores. Para todos los casos se deben elegir la alternancia entre niveles inferiores y superiores de

los valores continuos, es decir una temperatura, concentración o característica numérica controlable superior en cierta cantidad y uno inferior en la misma cantidad, comparado con un control de 3 o más mediciones sin alterar el método propuesto (Ferreira et al., 2017).

Factor 1	Factor 2	Respuesta
-	-	Y <sub>1</sub>
+	-	Y <sub>2</sub>
-	+	Y <sub>3</sub>
+	+	Y <sub>4</sub>
0	0	Y <sub>0</sub>
0	0	Y <sub>0</sub>
0	0	Y <sub>0</sub>

**Tabla 11.** Diseño factorial de dos bloques con 3 mediciones hechas bajo el método sin variación.

Las ecuaciones (20-24) para determinar la contribución de cada factor son:

$$E_{factor} = \left\{ \frac{Y(+)}{N/2} - \frac{Y(-)}{N/2} \right\} \quad \text{(Ecuación 20)}$$

Donde Y es la respuesta analítica cuando el valor del factor está en un nivel superior o inferior y N es igual a 2<sup>k</sup>, con k igual al número de factores.

Posteriormente se calcula el estimador de varianza del error experimental a través de:

$$S^2 = \frac{\sum(y_i - y_0)^2}{nr - 1} \quad \text{(Ecuación 21)}$$

Donde **y<sub>i</sub>** es el valor de respuesta sin cambios en los tratamientos **y<sub>0</sub>** es el promedio de los valores de respuestas sin variaciones en los tratamientos y **nr** es el número de repeticiones para los valores previamente mencionados.

De ello se desprende la desviación estándar de los efectos para los cuales todas son la misma, se calcula por medio de:

$$S_{efecto} = \left( \frac{4S^2}{N} \right)^{\frac{1}{2}} \quad \text{(Ecuación 22)}$$

Donde  $S^2$  es el estimador de varianza del error experimental.

Se puede escribir el intervalo de confianza para el efecto del factor como:

$$IC = E_{factor} \pm (S_{efecto}) \cdot (t) \quad \text{(Ecuación 23)}$$

Donde T es el valor T de Student al intervalo de confianza deseado con el número de repeticiones menos 1 de los valores sin cambio en los tratamientos.

Por último, se calcula el cociente del efecto entre la desviación del efecto, de esta forma se obtiene un estimador que al comparar con un valor T de Student con el nivel de confianza deseado tomando en cuenta que es una prueba a dos colas y el número de repeticiones del proceso sin cambios en el tratamiento, podemos identificar si tiene un efecto significativo en el proceso.

$$SE = \frac{E_{factor}}{S_{efecto}} \quad \text{(Ecuación 24)}$$

El valor de SE, es decir el estimador, puede obtenerse para cada efecto y presentarse en forma de un gráfico de Pareto donde se muestran en orden ascendente la influencia de cada efecto.

A continuación, se muestra el ejemplo tomado de “Robustness evaluation in analytical methods optimized using experimental designs, por Sergio L.C. Ferreira [2017]”, donde, durante la validación del método para la determinación de plomo en jugos de frutas por medio de Espectroscopia de absorción atómica electrotrémica con horno de grafito, se prueban los factores de robustez: temperatura de pirolisis, temperatura de atomización y concentración de ácido nítrico por medio de un diseño factorial completo, triplicando las mediciones del punto central (CP), es decir los valores decididos como óptimos para el método, respecto a los factores previamente mencionados, después se realiza la medición de todas las posibles combinaciones de un valor superior e inferior de cada factor (Tabla 12).

Experimento	[HNO <sub>3</sub> ] (M)	Temperatura de atomización (°C)	Temperatura de pirólisis (°C)	Absorbancia
1	1.00 (-1)	1746 (-1)	815 (-1)	0.05905
2	1.60 (1)	1746 (-1)	815 (-1)	0.05789
3	1.00 (-1)	2134 (1)	815 (-1)	0.05896
4	1.60 (1)	2134 (1)	815 (-1)	0.05577
5	1.00 (-1)	1746 (-1)	995 (1)	0.05909
6	1.60 (1)	1746 (-1)	995 (1)	0.05478
7	1.00 (-1)	2134 (1)	995 (1)	0.05879
8	1.60 (1)	2134 (1)	995 (1)	0.05752
CP	1.30 (0)	1940 (0)	905 (0)	0.05802
CP	1.30 (0)	1940 (0)	905 (0)	0.05709
CP	1.30 (0)	1940 (0)	905 (0)	0.05401

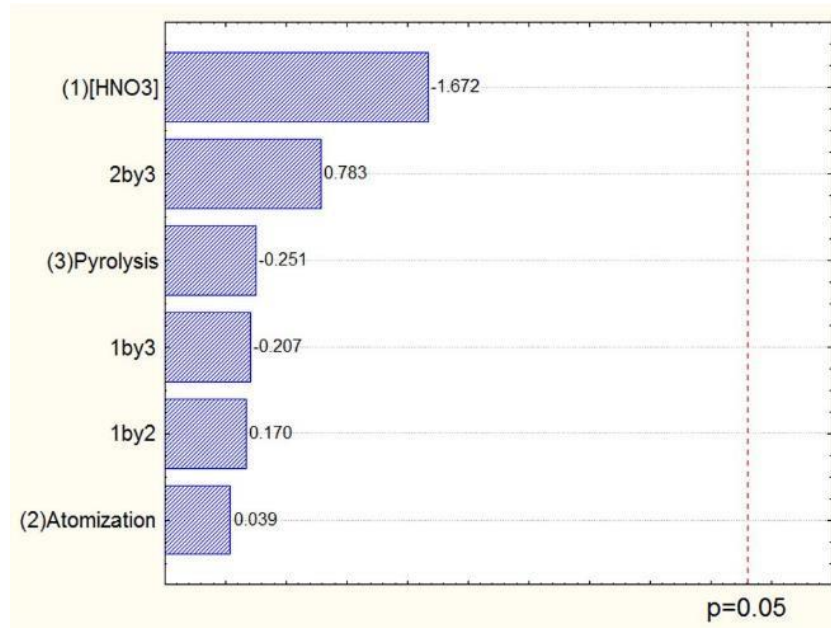
**Tabla 12.** Ejemplo de prueba de robustez (editada), En *Robustness evaluation in analytical methods optimized using experimental designs*, por Sergio L.C. Ferreira [2017]

Primeramente, los datos de absorbancia se utilizan con la ecuación 20, para demostrar los efectos de cada factor, posteriormente se obtiene el estimador de varianza del error experimental con la ecuación 21, considerando  $y_0$  el promedio de las mediciones del punto central y  $y_1$  el valor de cada medición del punto central, con 3 mediciones - 1 como grados de libertad, con este estimador se calcula la desviación de cada factor con la ecuación 22, para finalmente obtener el efecto estandarizado con la ecuación 24.

Como se observa en la tabla 13, el intervalo de confianza, calculado con la ecuación 23, incluyen al cero, por lo tanto, los efectos y sus interacciones no impactan de manera significativa en la absorbancia en el rango propuesto. Todos los resultados obtenidos son menores a 4.3207 valor T de student asociado al 95% de confianza con 2 grados de libertad. Estos resultados demuestran que el método es robusto en el rango de valores propuestos de temperatura de pirólisis, temperatura de atomización y concentración de ácido nítrico con  $905 \pm 90$  °C,  $1940 \pm 194$  °C y  $1.30 \pm 0.30$  M respectivamente.

	Efecto	Efecto como intervalo de confianza	Efecto estandarizado
[HNO <sub>3</sub> ]	-0.002483	-0.002483 ± 0.006368	-1.67
Atomization t.	0.000057	0.000057 ± 0.006368	0.04
Pyrolysis t.	-0.000373	-0.000373 ± 0.006368	-0.25
[HNO <sub>3</sub> ] × Atom t.	0.000252	0.000252 ± 0.006368	0.17
[HNO <sub>3</sub> ] × Pyro t.	-0.000307	-0.000307 ± 0.006368	-0.21
Atom t × Pyro t.	0.001163	0.001163 ± 0.006368	0.79

**Tabla 13.** Resultado de ecuaciones de los resultados de la prueba de robustez (editada), En *Robustness evaluation in analytical methods optimized using experimental designs*, por Sergio L.C. Ferreira [2017]



**Figura 3.** Gráfico de Pareto de los efectos estandarizados ordenados de mayor a menor, En *Robustness evaluation in analytical methods optimized using experimental designs*, por Sergio L.C. Ferreira [2017]

Para el caso de un diseño factorial  $2^k$  completo se puede obtener la contribución por interacciones con dos o más factores, no siendo posible para el diseño factorial fraccionado y el diseño Placket-Burman.

Los criterios para decidir si un factor tiene un efecto significativo en el proceso de análisis es:

- Intervalo de Confianza contenga el cero.
- $|SE| < T$  de student, para T con numero de mediciones -1 grados de libertad al intervalo de confianza deseado.

De cumplirse estos supuestos, se procede a decir que el método funciona para el factor i en el rango descrito en las pruebas utilizando como límite inferior y el límite superior los niveles sobre los cuales se realizó la validación de este parámetro de desempeño. De no cumplirse alguno de los dos se puede reducir los valores del límite superior e inferior del intervalo donde se quiere analizar el parámetro de desempeño y reportar estos rangos de trabajo.



### **Propuesta de orden de parámetros.**

Después de revisar cada parámetro, ninguna de las guías hace referencia en el orden de cómo deben ser probados cada uno de los parámetros, esto es ambiguo en el sentido de que el analista puede interpretar que cada parámetro puede desarrollarse independiente de otros y en el orden en que se presentan en las guías, lo cual no es totalmente cierto, ya que depende del tipo de método que se validará, si esta normalizado; si esta normalizado pero no diseñado para el propósito o si es una validación de un método nuevo, aunado a ello la naturaleza del analito y las características de la técnica complican la interpretación de las guías por parte del analista. Por ejemplo, algunos parámetros pueden realizarse al mismo tiempo y aunque esto afecte a la aleatoriedad de las mediciones dado que, se están controlando y limitando las variables que puedan afectar al experimento en esos instantes, se contrasta con la eficiencia de recursos que el analista pueda disponer. Para una validación total, en donde se mida la concentración de un analito por medio de una curva de calibración lo cual engloba muchas técnicas instrumentales, la propuesta de orden de parámetros de desempeño puede ser: (1) Selectividad; (2) Linealidad o Intervalo Lineal; (3) Veracidad (4) Límite de detección; (5) Límite de cuantificación; (6) Repetibilidad; (7) Precisión Intermedia; (8) Robustez.

Este orden tiene un sentido para una validación total, puesto que, primero se tiene que comprobar que bajo un método previamente estudiado el analito debe ser observado, es necesario saber que otras sustancias afectan al analito dentro de la matriz o si la propia matriz afecta su detección o cuantificación, es decir, desde un principio se conoce el resultado y con esta prueba se corrobora. Después esto se compara cuanto analito es recuperado, es decir, realizando una curva de calibración con el método propuesto y determinar la cantidad de analito recuperado, por ello, como se mencionó en el apartado de veracidad, es necesario no solo hacerlo por el método propuesto a través de la prueba de recobro, sino también compararlo con otro método a través de una prueba T de Student, y decidir si la cantidad determinada es aceptable para justificar este parámetro.

Definidos estos parámetros, se puede obtener los límites de cuantificación y detección del método ya que ambos requieren de los factores de la regresión para ser obtenidos, el límite inferior de la curva de calibración será obtenido por el límite de cuantificación.

Teniendo entonces los parámetros indispensables para el método (selectividad, veracidad, linealidad, límite de detección y cuantificación) se procede a evaluar los factores que pueden afectar al método, los analistas, los equipos y las condiciones ambientales, todos estos factores se ponen a prueba ejecutando el método, con distintos analistas y distintos equipos en distintos días pero dentro del mismo laboratorio, lo que corresponde a los parámetros de desempeño de Repetibilidad y Precisión Intermedia.

Por último, se describen los factores inherentes al desarrollo del método, como el tratamiento de la muestra y las condiciones de análisis dentro del equipo. Esta sección es referente al parámetro de robustez y está diseñada para predecir bajo qué circunstancias el método pueda funcionar y pueda ser evaluado en otros laboratorios.



**Figura 4.** Propuesta de esquema de validación de parámetros para una validación total por medio de una curva de calibración.

A lo largo de este análisis se ha observado importantes diferencias entre la guía EURACHEM y la guía de los Químicos Farmacéuticos Biológicos. Recordando que el objetivo de todo método analítico es que los métodos validados deben generar trazabilidad a una medición de referencia y deben ser reproducibles por quien realiza la medición, las mediciones químicas deben estar referidas a mediciones certificadas como correctas, pues de otra manera la probabilidad de que esta medición independiente no pertenezca al universo de mediciones es alta y por ello no puede generar trazabilidad. La guía EURACHEM toma en cuenta esto y resulta más adecuada para el desarrollo de métodos que puedan ser rastreados, es decir, homologar los resultados que se obtendrán a partir de los nuevos métodos, ya sea por qué resulta más económico el análisis o responda mejor a las necesidades y recursos de los laboratorios que lo van a ejecutar, con los resultados obtenidos a partir de métodos ya validados o desde materiales de referencia, los cuales especifican los valores objetivos del método. Desde otra perspectiva, la guía QFB asume que la trazabilidad se produce a partir de los resultados de quien realiza la medida con los métodos validados desde su guía, esto es correcto en el sentido de quienes sintetizan una nueva molécula y/o producen un nuevo medicamento, puesto que no existe una medición previa, ni una sustancia patrón de medida totalmente idéntica que permita comparar los resultados, por ello muchos de sus criterios de aceptación son semejantes, ya que obtener dichos valores asegura que la medición se realiza con al menos las características mínimas necesarias para justificar que se realizó correctamente.

Muchos de los cálculos presentados muestran solo una de las muchas formas en que pueden ser realizados, la guía EURACHEM no presenta los cálculos a fondo, algo que la guía QFB's si describe y eso facilita la interpretación por los analistas.

## **Conclusiones**

El eficiente desarrollo y validación de métodos es un elemento crítico para cualquier tipo de análisis y obtención de resultados útiles en la toma de decisiones. Aunque pareciera que la validación corresponde únicamente a la demostración de que se cumplen los parámetros de desempeño, esto no debe extrapolarse al tipo de guía que se utiliza, de esto, nace la necesidad de armonizar las guías para generar resultados trazables metrológicamente, y a su vez generar valores de uniformidad en el análisis de resultados de la validación de los parámetros que componen el desarrollo del método analítico.

## Bibliografía

- Alhogbi, B. G. (2017). DEVELOPMENT AND VALIDATION OF DERIVATIVE UV SPECTROPHOTOMETRIC METHOD FOR DETERMINATION OF DULOXETINE. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 53(9), 21–25. [https://doi.org/10.13040/IJPSR.09758232.12\(2\).937-43](https://doi.org/10.13040/IJPSR.09758232.12(2).937-43)
- Análisis Instrumental Métodos de estimación de Límite de Detección y Límite de Cuantificación en metodologías instrumentales.* (1993).
- Araujo, P. (2009). Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 877(23), 2224–2234. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2008.09.030>
- Ashour, S., & Khateeb, M. (2013). Conductometric Titration Method for Determination of Alfuzosin Hydrochloride and Fexofenadine Hydrochloride Using Sodium Tetraphenylborate. *Canadian Chemical Transactions*, January, 292–304. <https://doi.org/10.13179/canchemtrans.2013.01.04.0047>
- Bobacka, J., Ivaska, A., & Lewenstam, A. (2008). ChemInform Abstract: Potentiometric Ion Sensors. *ChemInform*, 39(17). <https://doi.org/10.1002/chin.200817252>
- Chromatography. (1997). The Family of Chromatographic Techniques. *Techniques*, 40–64.
- Cubadda, F. (2007). Inductively coupled plasma mass spectrometry. *Food Toxicants Analysis*, 697–751. <https://doi.org/10.1016/B978-044452843-8/50020-1>
- De Bièvre, P., & Günzler, H. (2005). Traceability in chemical measurement. *Traceability in Chemical Measurement*, 1–297. <https://doi.org/10.1007/b138593>
- Edwards, A. A., & Alexander, B. D. (2016). UV-visible absorption spectroscopy, organic applications. *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry*, 511–519. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803224-4.00013-3>
- Elgrishi, N., Rountree, K. J., McCarthy, B. D., Rountree, E. S., Eisenhart, T. T., & Dempsey, J. L. (2018). A Practical Beginner's Guide to Cyclic Voltammetry. *Journal of Chemical Education*, 95(2), 197–206. <https://doi.org/10.1021/acs.jchemed.7b00361>
- Ferreira, S. L. C., Caires, A. O., Borges, T. da S., Lima, A. M. D. S., Silva, L. O. B., & dos Santos, W. N. L. (2017). Robustness evaluation in analytical methods optimized using experimental designs. *Microchemical Journal*, 131(December), 163–169. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2016.12.004>
- Frag, E. Y., El badry Mohamed, M., Mohamed, G. G., & Ebrahim, M. S. (2020). Selective potentiometric sensors for the determination of butenafine hydrochloride in a cream formulation. *Microchemical Journal*, 157(February), 104870. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.104870>
- García, M. A., Soberón, E., Cortés, M., Rodríguez, R., Herrera, J. L., & Alcantara, A. (2002). Guía de validación de métodos analíticos (Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México, A.C.). *Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos*, 132.

- García, R., & Báez, A. P. (2012). Atomic absorption spectrometry (AAS). *Atomic absorption spectroscopy*, 1, 1-13.
- Gašlje, V. (2010). *Method validation and measurement uncertainty*. 3(1), 57–63.
- Hoyos-Arbeláez, J., Vázquez, M., & Contreras-Calderón, J. (2017). Electrochemical methods as a tool for determining the antioxidant capacity of food and beverages: A review. *Food Chemistry*, 221, 1371–1381. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.11.017>
- Hubert, P., Nguyen-Huu, J. J., Boulanger, B., Chapuzet, E., Chiap, P., Cohen, N., Compagnon, P. A., Dewé, W., Feinberg, M., Lallier, M., Laurentie, M., Mercier, N., Muzard, G., Nivet, C., Valat, L., & Rozet, E. (2007). Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures. A SFSTP proposal - Part II. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 45(1), 70–81. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2007.06.013>
- Kokosa, J. M. (2019). Dispersive liquid-liquid microextraction. In *Liquid-Phase Extraction* (Vol. 2). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816911-7.00016-5>
- Kutscher, D., Lofthouse, S., Nelms, S., & Ducos, S. M. S. (2017). Effective removal of isobaric interferences on strontium and lead using triple-quadrupole ICP-MS. *Spectroscopy (Santa Monica)*, 32(10), 38–41.
- Long, G. L., & Winefordner, J. D. (1983). Limit of Detection: A Closer Look at the IUPAC Definition. *Analytical Chemistry*, 55(7), 713A-724A. <https://doi.org/10.1021/ac00258a724>
- Lopez, P., Buffoni, E., Pereira, F., & Vilchez Quero, J. L. (2011). Analytical Method Validation. *Wide Spectra of Quality Control*. <https://doi.org/10.5772/21187>
- Magarelli, G., da Silva, J. G., Sousa Filho, I. A. de, Lopes, I. S. D., SouzaDe, J. R., Hoffmann, L. V., & De Castro, C. S. P. (2013). Development and validation of a voltammetric method for determination of total phenolic acids in cotton cultivars. *Microchemical Journal*, 109, 23–28. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2012.05.014>
- Moldoveanu, S. C., & David, V. (2017). Short Overviews of Analytical Techniques Not Containing an Independent Separation Step. *Selection of the HPLC Method in Chemical Analysis*, 31–53. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-803684-6.00002-0>
- Örnemark, “B. Magnusson and U. (2016). Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods. In *Planta Medica* (Vol. 56, Issue 6). <https://doi.org/10.1055/s-2006-961117>
- Peters, F. T., Drummer, O. H., & Musshoff, F. (2007). Validation of new methods. *Forensic Science International*, 165(2–3), 216–224. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2006.05.021>
- Reutemann, G., & Huber, H. (2003). Validation of titration methods. *Switzerland: Mettler-Toledo*, 1–28.
- Rivera, C., & Rodriguez, R. (2010). HORWITZ EQUATION AS QUALITY BENCHMARK IN ISO / IEC 17025 Horwitz Ratio ( HorRat ). *IIE Annual Conference*.
- Shah, N., Arain, M. B., & Soylak, M. (2020). Historical background: milestones in the field of development of analytical instrumentation. In *New Generation Green Solvents for Separation and Preconcentration of Organic and Inorganic Species*. INC. <https://doi.org/10.1016/b978-012-818569-8.00002-4>

- Sulthoniyah, D., Primaharinastiti, R., & Annuryanti, F. (2018). Method validation of flame atomic absorption spectrophotometry (FAAS) for determination of iron (FE) in multivitamin mineral capsule dosage form. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, *11*(6), 2569–2574. <https://doi.org/10.5958/0974-360X.2018.00475.4>
- Thompson, M., Ellison, S. L. R., & Wood, R. (2002). Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*, *74*(5), 835–855. <https://doi.org/10.1351/pac200274050835>
- Umarov, U. A., Maslov, O. Y., Kolisnyk, S. V., & Fathullaeva, M. (2020). Development and validation of the conductometric titration method of quantitative determination of free organic acids in the anise fruits. *European Journal of Molecular and Clinical Medicine*, *7*(3), 3874–3883.
- USEPA. (2016). Definition and procedure for the determination of the method detection limit—Revision 1.11. *Epa 821-R-16-006*, December, 1–8. [https://www.law.cornell.edu/cfr/text/40/part-136/appendix-B%5Cnhttp://www.epa.gov/region9/qa/pdfs/40cfr136\\_03.pdf](https://www.law.cornell.edu/cfr/text/40/part-136/appendix-B%5Cnhttp://www.epa.gov/region9/qa/pdfs/40cfr136_03.pdf)
- USPC Official. (2008). Usp–nf VALIDATION OF COMPENDIAL PROCEDURES. *USPC Official*, 1–10.
- Vander Heyden, Y., Nijhuis, A., Smeyers-Verbeke, J., Vandeginste, B. G. M., & Massart, D. L. (2001). Guidance for robustness/ruggedness tests in method validation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *24*(5–6), 723–753. [https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(00\)00529-X](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(00)00529-X)
- VIM, O. I. de M. L. (2012). Vocabulario Internacional de Metrología Conceptos fundamentales y generales, y términos asociados. *JCGM*, *3*(2), 1–88. <https://doi.org/10.1021/ja01341a021>
- Volmer, D. A., Curbani, L., Parker, T. A., Garcia, J., Schultz, L. D., & Borges, E. M. (2017). Determination of Titratable Acidity in Wine Using Potentiometric, Conductometric, and Photometric Methods. *Journal of Chemical Education*, *94*(9), 1296–1302. <https://doi.org/10.1021/acs.jchemed.6b00891>
- Ward, A. F. (1984). Inductively Coupled Plasma. *Standardization News*, *12*(2), 31–35. <https://doi.org/10.1017/cbo9780511974342.007>
- Wawrzyniak, J., Ryniecki, A., & Zembrzuski, W. (2005). Application of voltammetry to determine vitamin C in apple juices. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, *4*(2), 5–16.
- Imágenes de la figura 4, diseñadas por: *dinosoftlabs, eucalyp, freepik, ultimatearm, vectors market. Obtenidas de Flaticon.com*