



GOBIERNO DE CHILE
MINISTERIO DE AGRICULTURA
SAG



IMPLEMENTACIÓN DEL SISTEMA PARA LA VALIDACIÓN DE LOS MÉTODOS DE ANÁLISIS Y MEDICIONES DE LABORATORIO EN SUELOS Y LODOS.

Universidad de Concepción Facultad de de Agronomía Chillán.
Erick Zagal¹, Angélica Sadzawka R²

Elaborado con la participación de la Comisión de Normalización y Acreditación de la Sociedad Chilena de la Ciencia del Suelo, por encargo del Servicio Agrícola y Ganadero.

2007

¹ Universidad de Concepción, Facultad de Agronomía, Chillán

² Miembro Comisión de Normalización y Acreditación, Sociedad Chilena de la Ciencia del Suelo.

INTRODUCCIÓN

La validación de métodos es un procedimiento para establecer por medio de estudios de laboratorio una demostración científica que un método analítico tiene las características de desempeño que son adecuadas para cumplir los requerimientos de las aplicaciones analíticas pretendidas. Por lo tanto, es un componente esencial de las medidas que un laboratorio debe implementar para producir datos analíticos fiables.

Este documento está orientado a la validación de los métodos incluidos en el “Protocolo de métodos de análisis para suelos y lodos”, y contó con la asesoría de la experta Angélica Sadzawka y la participación de Erick Zagal, María Adriana Carrasco, Rolando Demanet, Hugo Flores, Renato Grez, Pedro Hernández, María de Luz Mora, Alexander Reaman y Gisela Romeny todos integrantes de la Comisión de Normalización y Acreditación (CNA), de la Sociedad Chilena de la Ciencia del Suelo, la que fue creada para desarrollar un Programa de Normalización de Técnicas y de Acreditación de Laboratorios para el análisis de suelos y de tejidos vegetales.

Los métodos de análisis incluidos en dicho documento fueron seleccionados principalmente de la EPA (United States Environmental Protection Agency), por lo tanto son métodos oficiales. Pero, ello no garantiza que el funcionamiento sea satisfactorio en cualquier laboratorio que los use. Por lo tanto, siempre que un laboratorio monta un método, debe validarlo bajo sus condiciones, porque cualquier cambio introducido puede afectar sus características. La ventaja de usar métodos estándares, oficiales o normalizados, es que la validación no requiere determinar la totalidad de los parámetros analíticos básicos, sino solamente una selección de ellos. Esta selección dependerá de las características del método y del laboratorio, aunque el reconocimiento oficial de que un laboratorio está ejecutando en forma adecuada un método puede requerir además estudios interlaboratorios.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
INTRODUCCIÓN	2
1 TÉRMINOS Y DEFINICIONES	4
2 PRINCIPIOS BÁSICOS DE LA VALIDACIÓN DE MÉTODOS.....	8
3 CALIBRACIÓN	9
4 LÍMITE DE DETECCIÓN Y LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN	13
5 EXACTITUD, SESGO	15
6 PRECISIÓN	16
7 SENSIBILIDAD	16
8 RANGO DE TRABAJO.....	17
9 ESPECIFICIDAD	17
10 SELECTIVIDAD	18
11 RECUPERACIÓN	18
12 ROBUSTEZ.....	19
13 INTERFERENCIAS	21
14 APLICABILIDAD.....	21
15 ADECUACIÓN AL PROPÓSITO	21
16 BIBLIOGRAFÍA.....	21

1 TÉRMINOS Y DEFINICIONES

- 1.1 Análisis:** en el ámbito químico, implica someter a una muestra a un proceso analítico para conocer información sobre la misma (NCh 2725, 2002).
- 1.2 Calibración:** conjunto de operaciones que establecen, en condiciones especificadas, la relación entre los valores de una magnitud indicados por un instrumento de medición o por un sistema de medición, o los valores representados por una medida materializada o por un material de referencia, y los valores correspondientes de esa magnitud materializados por patrones (NCh 2737, 2002).
- 1.3 Curva de calibración (estándar):** representación gráfica bidimensional que muestra la variación de la señal analítica en función de la variación de la concentración de la solución patrón (estándar) (NCh 2766, 2003).
- 1.4 Ensayo:** una operación técnica que consiste en la determinación de una o más características o del comportamiento de un determinado producto, material, equipo, organismo, fenómeno físico, proceso o servicio, de acuerdo a un procedimiento especificado (NCh 2725, 2002).
- 1.5 Error**
- 1.5.1 error de una medida:** resultado de una medición menos un valor verdadero de un mensurando (NCh 2755/1, 2003).
- Nota**
Considerando que un valor verdadero no se puede determinar, en la práctica se usa un valor verdadero convencional.
- 1.5.2 error aleatorio:** resultado de una medición menos la media de un número infinito de mediciones del mismo mensurando, efectuadas bajo condiciones de repetibilidad (NCh 2755/1, 2003).
- 1.5.3 error sistemático:** media que resultaría de un número infinito de mediciones del mismo mensurando efectuadas bajo condiciones de repetibilidad, menos un valor verdadero del mensurando ((NCh 2755/1, 2003).
- Nota**
Para un instrumento de medida se utiliza el sesgo.
- 1.6 Especificidad**
Habilidad de evaluar inequívocamente el analito en presencia de componentes que se puede esperar que estén presentes. Típicamente éstos pueden incluir impurezas, productos de degradación, la matriz, etc.
- 1.7 Exactitud:** grado de concordancia entre el resultado de un ensayo y el valor de referencia aceptado (NCh 2755/1, 2003). También se puede definir como la cercanía entre el valor que es aceptado, ya sea como un valor convencional verdadero (material de referencia interno del laboratorio), o como un valor de

referencia aceptado (material de referencia certificado) y el valor promedio obtenido al aplicar el procedimiento de análisis un cierto número de veces.

- 1.8 Fortificar:** acción de añadir un analito, sustancia, matriz química o un material de referencia certificado a una muestra en cualquier etapa de un análisis químico, para realzar la respuesta del sistema de medición con un objetivo determinado (NCh 2755/1, 2003).
- 1.9 Incertidumbre de una medida:** parámetro asociado al resultado de una medición, que caracteriza la dispersión de los valores que podrían razonablemente ser atribuidos al mensurando (NCh 2755/1, 2003).
- 1.10 Manual de calidad:** documento que establece la política de calidad y describe el sistema de calidad de una organización (NCh-ISO 10013, 1994).
- 1.11 Material de referencia:** material o sustancia en que uno o varios valores de la(s) propiedad(es) es(son) suficientemente homogéneo(s) y bien definido(s) para permitir su uso para calibrar un aparato, evaluar un método de medición o asignar valores a materiales (NCh 2737, 2002).
- 1.12 Material de referencia certificado (MRC):** material de referencia, acompañado de un certificado, en que uno o varios valores de la(s) propiedad(es) está(n) certificado(s) por un procedimiento que establece su trazabilidad a una realización exacta de la unidad en que están expresados los valores de la propiedad y para la cual cada valor certificado está acompañado de una incertidumbre a un nivel de confianza indicado (NCh 2737, 2002).
- 1.13 Medición:** conjunto de operaciones que tienen por finalidad determinar un valor de una magnitud (NCh 2755/1, 2003).
- 1.14 Mensurando:** magnitud particular sujeta a medición (NCh 2755/1, 2003).
- 1.15 Método analítico:** conjunto de operaciones específicas para caracterizar cuali y cuantitativamente a un analito (o familia) en una determinada muestra. Implica el empleo de una técnica (instrumento) y supone la concreción del proceso de medida química (NCh 2725, 2002).
- 1.16 Precisión:** grado de concordancia entre resultados de ensayos independientes obtenidos bajo condiciones estipuladas (NCh 2755/1, 2003).
- 1.17 Procedimiento Normalizado de Trabajo (PNT):** documento que describe detalladamente las instrucciones explícitas para llevar a cabo un procedimiento o método según los niveles de tolerancia impuestos para los resultados finales.
- 1.18 Repetibilidad**

- 1.18.1 repetibilidad:** precisión bajo condiciones de repetibilidad (NCh 2766, 2003).
- 1.18.2 condiciones de repetibilidad:** condiciones en que se obtienen resultados de ensayo independientes con el mismo método sobre ítemes de ensayo idénticos en el mismo laboratorio por el mismo operador usando el mismo equipo dentro de intervalos cortos de tiempo (NCh 2766, 2003).
- 1.18.3 límite de la repetibilidad:** valor menor o igual al cual la diferencia absoluta entre dos resultados de ensayo obtenidos bajo condiciones de repetibilidad se puede esperar que sea con una probabilidad de 95%. Se designa por el símbolo r (NCh 2766, 2003).

1.19 Reproducibilidad

- 1.19.1 reproducibilidad:** precisión bajo condiciones de reproducibilidad (NCh 2766, 2003).
- 1.19.2 condiciones de reproducibilidad:** condiciones en que se obtienen resultados de ensayo con el mismo método sobre ítemes de ensayo idénticos en diferentes laboratorios con operadores usando equipos diferentes (NCh 2766, 2003).
- 1.19.3 límite de la reproducibilidad:** valor menor o igual al cual la diferencia absoluta entre dos resultados de ensayo obtenidos bajo condiciones de reproducibilidad se puede esperar que sea con una probabilidad de 95%. Se designa por el símbolo R (NCh 2766, 2003).

1.20 Robustez: propiedad analítica de un proceso de medida química que describe su resistencia al cambio cuando se varían ligeramente las condiciones experimentales en las que se desarrolla (NCh 2755/1, 2003).

1.21 Selectividad: habilidad de un procedimiento analítico para diferenciar entre varios componentes de una mezcla.

1.22 Sesgo: desviación consistente de los resultados analíticos del valor de referencia aceptado causado por errores sistemáticos en el procedimiento.

1.23 Técnica: principio científico que se utiliza para extraer información analítica (NCh 2725, 2002).

1.24 Trazabilidad: propiedad del resultado de una medición, o del valor de un patrón, tal que puede relacionarse con referencias establecidas, generalmente patrones nacionales o internacionales, a través de una cadena ininterrumpida de comparaciones, todas ellas con incertidumbres determinadas (NCh 2755/1, 2003).

1.25 Términos estadísticos

- 1.25.1 análisis de regresión:** se usa para predecir el valor de la variable dependiente (Y) basada en la variable independiente (X).
- 1.25.2 coeficiente de determinación (R^2):** proporción de la variación total en la variable dependiente (Y) que está explicada por o se debe a la variación en

la variable independiente (X). El coeficiente de determinación es el cuadrado del coeficiente de correlación, y toma valores de 0 a 1.

1.25.3 coeficiente de variación (CV): desviación estándar de una población de n resultados de una muestra dividida por la media de esa muestra. Frecuentemente se expresa en porcentaje.

$$CV(\%) = \frac{S}{\bar{X}} \times 100$$

1.25.4 media aritmética (\bar{x}): valor promedio obtenido de n resultados de una muestra (NCh 2755/1, 2003).

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

1.25.5 desviación estándar de la muestra (s): estimación de la desviación estándar de una población por medio de n resultados de una muestra (NCh 2755/1, 2003).

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

1.25.6 desviación estándar de la media ($s_{\bar{x}}$): desviación estándar de la media \bar{x} de n valores tomados de una población; se expresa por:

$$s_{\bar{x}} = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

Los términos *error estándar* y *error estándar de la media* se han usado para describir la misma cantidad (NCh 2755/1, 2003).

1.26 Validación de un método analítico: Procedimiento para establecer por medio de estudios de laboratorio una demostración científica que un método analítico tiene las características de desempeño que son adecuadas para cumplir los requerimientos de las aplicaciones analíticas pretendidas.

2 PRINCIPIOS BÁSICOS DE LA VALIDACIÓN DE MÉTODOS

La validación de métodos se considera diferente de las actividades que se realizan repetidamente, como el control de calidad interno o los ensayos de aptitud. La validación de métodos se lleva a cabo una vez, o a intervalos relativamente infrecuentes, durante la vida útil de un método.

La validación se aplica a un protocolo definido, denominado *Procedimiento Normalizado de Trabajo (PNT)* para determinar un analito específico y el rango de concentraciones en un tipo de material de prueba particular utilizado para un propósito específico. Los PNT son documentos que describen detalladamente las instrucciones explícitas para llevar a cabo un procedimiento o método según los niveles de tolerancia impuestos para los resultados finales. Más aún, el proceso completo desde la recepción de la muestra hasta la entrega final del resultado analítico debe estar descrito en una serie continua de PNT.

Los métodos descritos en el documento “Métodos de análisis de lodos y de suelos”, pueden usarse como PNT a menos que el Jefe del Laboratorio considere que es necesario un mayor detalle en las instrucciones.

La validación de métodos emplea un conjunto de pruebas que comprueban todas las hipótesis en las que se basa el método analítico, y establecen y documentan las características de rendimiento de un método, demostrando así si dicho método es adecuado para un propósito analítico particular. Las características de rendimiento de los métodos analíticos son:

- Calibración
- Límite de detección
- Límite de cuantificación
- Exactitud, sesgo
- Precisión
- Sensibilidad
- Rango de trabajo
- Especificidad
- Selectividad
- Recuperación
- Robustez
- Interferencias
- Aplicabilidad
- Adecuación al propósito.

Debido a que los “Métodos de análisis de lodos y suelos” se seleccionaron principalmente de publicaciones oficiales, un laboratorio con experiencia no requiere determinar todas las características indicadas para validarlos, sino solamente una selección de ellas. Sin embargo, en esta guía, se dará una reseña de todas ellas ante la eventual necesidad de utilizarlas en otros métodos.

3 CALIBRACIÓN

3.1 Principio

La calibración de instrumentos (incluyendo el ajuste) también se conoce como estandarización. Así los términos *curva de calibración* y *curva estándar* se usan generalmente como sinónimos.

En muchas técnicas de medida se deben construir gráficos de calibración, que consisten simplemente en dibujar la respuesta del instrumento contra una serie de muestras que contienen concentraciones conocidas del analito (estándares). En la práctica, estos estándares generalmente son sustancias químicas puras dispersas en una matriz semejante a la de las muestras a analizar. Por convención, el gráfico de calibración siempre se dibuja con la concentración de los estándares en el eje de las X (abscisa) y la lectura de la respuesta del instrumento en el eje de las Y (ordenada). La concentración del analito en las muestras se obtiene por interpolación, nunca por extrapolación, de manera que debe elegirse un rango apropiado para los estándares. La condición ideal es que la relación señal/concentración sea lineal en el rango de trabajo. Sin embargo, muchos métodos son lineales sólo a bajas concentraciones del analito y, en ocasiones incluso, la relación señal/concentración es curvilínea en todo el intervalo de concentraciones. En estos casos, deben usarse regresiones polinomiales, aunque muchos equipos modernos realizan la linearización de gráficos no lineales en forma transparente para el usuario.

Algunas prácticas comunes para obtener los gráficos de calibración son:

- Los estándares se preparan en la misma composición del extractante usado para las muestras, con el mismo factor de dilución. Es la práctica más usada.
- Los estándares se preparan en el extracto del blanco. Esta práctica es útil cuando se analizan pocas muestras o cuando el extractante es inestable.
- Uso de la técnica llamada *adición de estándares*, que consiste en tomar alícuotas del extracto de la muestra, agregar diferentes cantidades de analito y diluir a un volumen final. Una alícuota se usa sin adición de analito, obteniéndose así la serie de estándares. Esta práctica se usa cuando se quiere evitar diferencias de matriz entre las muestras y los estándares.

3.2 Ajuste lineal

Una vez obtenidas las respuestas del instrumento a la serie de estándares de al menos seis puntos, se debe dibujar el gráfico de calibración, ya sea en el mismo equipo de medición, si lo permite, o en el computador usando un programa que permita calcular la ecuación y el coeficiente de determinación. En una relación lineal, la ecuación de regresión toma la forma de:

$$y = bx + a \quad \text{con un coeficiente de determinación } R^2$$

donde:

y	=	lectura del instrumento
x	=	concentración del analito
b	=	pendiente
a	=	intercepto

Idealmente el intercepto a es cero, sin embargo, debido a interacciones, interferencias, ruido, contaminación, etc., esto raramente ocurre. Por lo tanto, el intercepto a puede ser considerado como la señal del blanco.

La pendiente b es una medida de la *sensibilidad* del procedimiento. Mientras mayor es la respuesta del instrumento a un cambio en la concentración del analito, mayor es la sensibilidad del procedimiento.

El coeficiente de determinación R^2 , también llamado bondad de ajuste, tiene la ventaja sobre el coeficiente de correlación (r) que, cuando se multiplica por 100, indica el porcentaje de variación en y asociado con la variación en x . En los gráficos de calibración, normalmente los valores de R^2 son cercanos 1. Cuando son menores a, por ej., 0,99, es una advertencia de que la relación no es lineal, o que debe repetirse o revisarse el procedimiento. Por otra parte, un valor de R^2 alto no siempre significa linealidad, por lo tanto, *siempre* debería dibujarse el gráfico de calibración.

Si el valor de R^2 es alto (por ej. $>0,99$) pero la linealidad es dudosa al examen visual, se puede aplicar la siguiente prueba. Determinar para 2 o 3 de los puntos de calibración más altos la desviación relativa de los valores medidos de y de los calculados de la línea:

$$\text{desviación (\%)} = \left| \left(\frac{y_i}{bx_i + a} - 1 \right) \right| \times 100$$

- Si las desviaciones son $<5\%$, la curva puede ser aceptada como lineal.
- Si las desviaciones son $>5\%$, el rango se disminuye dejando fuera las concentraciones más altas.
- Repetir el cálculo de la regresión lineal.
- Repetir el procedimiento hasta que las desviaciones sean $<5\%$.

En situaciones en que un gráfico de calibración es lineal en un intervalo de concentraciones y curvo en otro, es de gran importancia establecer claramente el intervalo que se puede considerar lineal.

Una vez que se ha establecido el gráfico de calibración, su uso es simple: la concentración x_i del analito en la muestra i la entrega directamente el instrumento o se calcula del valor de y_i medido según la ecuación:

$$x_i = \frac{y_i - a}{b}$$

3.3 Ajuste polinomial

Cuando los valores no se ajustan a un modelo de regresión lineal, la aproximación más general es ensayar un polinomio del tipo:

$$y = a + bx + cx^2 + dx^3 + \dots$$

El problema es cuántos términos deben incluirse en la expresión polinómica y cómo calcular los valores de los coeficientes. En la práctica, es recomendable no usar más allá del ajuste cuadrático y calcular los coeficientes usando los paquetes informáticos disponibles.

Para decidir el mejor ajuste del gráfico de calibración se recurre al *análisis de varianza* (ANDEVA), que permite calcular el coeficiente de determinación ajustado (R^2) y hacer el análisis de residuales.

Una forma más sencilla es hacer al gráfico de calibración, colocando solamente los puntos, luego insertar una línea de tendencia lineal con la ecuación y el coeficiente de determinación. Si visualmente, los puntos en los extremos de la línea de tendencia están bajo la línea y los puntos centrales están sobre la línea, es una indicación clara de que el ajuste lineal no es el adecuado, aun cuando el valor de R^2 sea $> 0,99$. A continuación, se prueba el ajuste cuadrático insertando una línea de tendencia polinomial de orden 2 (cuadrática) con su ecuación y coeficiente de determinación. Si la distribución de puntos a lo largo de la nueva línea no muestra una tendencia, significa que la relación entre la concentración del analito y la señal se ajusta mejor al modelo cuadrático. La ecuación de regresión cuadrática tiene la forma:

$$y = a + bx + cx^2$$

Y, para calcular la concentración del analito en las muestras, se usa la siguiente fórmula:

$$x_i = \frac{-b + \sqrt{b^2 - 4c(a - y_i)}}{2c}$$

donde:

x_i	=	concentración de analito en la muestra i
a	=	intercepto
b	=	coeficiente del término lineal
c	=	coeficiente del término cuadrático
y_i	=	señal del instrumento para la muestra i

Es importante tener en cuenta que durante los cálculos se trabaja con todas las cifras decimales y se redondean solamente al final. Para producir un mínimo sesgo, por convención el redondeo se hace como sigue:

- Si el último número es 4 o menor, dejar el número precedente.
- Si el último número es 6 o mayor, aumentar el número precedente en 1.
- Si el último número es 5 y el número precedente es par, este se deja.
- Si el último número es 5 y el número precedente es impar, este se aumenta en 1.

Normalmente, la mayoría de los programas de cálculos computacionales, cuando el último número es 5, aumentan el número precedente en 1. No hay objeción a esta práctica en la medida que no cause un sesgo importante.

3.4 Incertidumbre de la línea de regresión

En el gráfico de calibración, generalmente los puntos de las respuestas del instrumento no caen exactamente en la línea, debido a que hay errores aleatorios implicados. Estos se expresan en incertidumbres asociadas a los valores estimados de Y , al intercepto y a la pendiente. Las desviaciones de los valores de X no se consideran porque se asume que los estándares fueron muy bien preparados.

La cuantificación de las incertidumbres se realiza a través de la desviación estándar (también llamada error típico), que la mayoría de los programas computacionales de regresión entregan automáticamente. Así, se obtienen:

- s_y = desviación estándar residual de los valores estimados de y .
- s_a = desviación estándar del intercepto a
- s_b = desviación estándar de la pendiente

La incertidumbre es $t \cdot s$, siendo t un valor estadístico que depende del número de datos y de la confianza requerida (usualmente 95%). Por lo tanto, los límites de confianza de la ecuación de regresión son:

- y estimado: $\hat{y} \pm t s_y$
- intercepto : $a \pm t s_a$
- pendiente : $b \pm t s_b$

La incertidumbre asociada a los valores estimados de y se transfiere a los valores de x de las muestras calculados con la ecuación de regresión y puede ser expresada por la desviación estándar de los valores calculados de x . Una aproximación útil para este cálculo es:

$$s_x = \frac{s_y}{b}$$

De manera que el límite de confianza de los resultados de las muestras, x_m , puede calcularse como:

$$x_m \pm t \frac{s_y}{b}$$

Para una confianza del 95% y un gráfico de calibración de 6 puntos, el valor de t según tabla es de 2,78 para 4 grados de libertad (6 – 2). El límite de confianza puede estrecharse aumentando el número de puntos del gráfico de calibración.

El valor de s_x así calculado puede ser sólo aproximado porque se considera constante en el rango, lo cual generalmente no ocurre en la realidad, ya que es común que las mediciones sean más precisas en el centro del gráfico de calibración que en los extremos. Pero, en la práctica, tal estimación del error generalmente es suficiente.

Es importante considerar que cuando la determinación del analito es parte de un procedimiento con varias etapas, el error debido a la lectura se agrega a los errores de las otras etapas, constituyendo el *error total del procedimiento completo*, que es la estimación de confianza más útil cuando se informan los resultados. Este se obtiene del promedio y la desviación estándar de varias repeticiones (>10) realizadas en muestras de control o de los gráficos de control en los análisis de rutina. En este caso, para un nivel de confianza del 95%, el resultado del análisis de una muestra sin repeticiones se informa como:

$$x \pm 2s$$

donde:

s = desviación estándar del gran número de repeticiones.

4 LÍMITE DE DETECCIÓN Y LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN

4.1 Blancos

Se pueden distinguir dos tipos de blancos:

- Blanco del método completo
- Blanco del método de medición

Las señales de los blancos generalmente no son cero, incluso pueden ser negativas, lo cual puede ser debido a un error en el procedimiento o también a un efecto de la matriz de la solución, lo cual a menudo es inevitable. Por conveniencia, algunos analistas ajustan a cero el instrumento con el blanco de medición (estándar 0). Esto equivale a sustraer el valor del blanco de los valores de los estándares antes de graficar la curva de calibración. Desde el punto de vista del control de calidad, esta práctica no debe realizarse. Para el ajuste del cero del instrumento debe preferirse el uso de agua pura o agua con ácido en la misma concentración de las muestras.

En el proceso de validación de métodos deben realizarse al menos 10 determinaciones de los blancos (tanto de medición como del método completo) y luego calcular el promedio y la correspondiente desviación estándar de cada tipo de blanco.

4.2 Límite de detección

Para una apropiada validación y selección de un procedimiento o método analítico, es importante tener la información del menor límite al cual el analito puede ser detectado o determinado con suficiente confianza. Para ello, se usan algunos conceptos como *límite de detección* (que a menudo se confunde con *sensibilidad*) y *límite de detección del método* que se aplica al procedimiento completo, a diferencia del primero que se aplica a las mediciones como parte del método.

La definición más aceptable para **límite de detección** (LD) es *la concentración de analito que da una señal igual al blanco más 3 veces la desviación estándar del blanco (s_{bl})*, calculada de al menos 10 determinaciones del blanco. Debido a que en el cálculo de los resultados analíticos se resta el valor del blanco, el LD puede escribirse como:

$$LD = 3 \times s_{bl}$$

Cuando se usa un gráfico de calibración no se requieren las repetidas determinaciones del blanco, ya que el valor del blanco junto con su desviación estándar resultan directamente del análisis de regresión.

4.3 Límite de cuantificación

Para algunos propósitos se usa **límite de determinación** o **límite de cuantificación** (LC) definido como *dos veces el límite de detección* o en otras ocasiones como *diez veces la desviación estándar del blanco*:

$$LC = 2 \times LD = 6 \times s_{bl}$$

$$LC = 10 \times s_{bl}$$

5 EXACTITUD, SESGO

Una de las principales características de un método que se debe conocer es si el resultado refleja el valor “verdadero” para el analito o propiedad. Y, si no es así, si puede cuantificarse y posiblemente corregirse el sesgo.

Para responder estas preguntas, se usan referencias externas, directa o indirectamente. El procedimiento *directo* consiste en realizar análisis repetidos ($n \geq 10$) con el método sobre una muestra de referencia (de preferencia certificada) con un contenido conocido de analito.

Para los métodos empíricos, es decir, aquellos en que el resultado depende del método, es poco probable encontrar muestras de referencia disponibles. En estos casos, pueden usarse los procedimientos siguientes:

- comparación de los resultados del método con aquellos de un método de referencia, ambos aplicados en las mismas muestras
- disponer de muestras analizadas en otro laboratorio
- participación en programas de intercomparación de laboratorios.

La exactitud de un resultado analítico puede ser sensible a variaciones en las condiciones (concentración de analito, matriz, extracto, temperatura, etc.). Por lo tanto, si un método se aplica a un amplio rango de materiales, debe validarse en distintas muestras de diferentes concentraciones de analito.

Numéricamente, la exactitud se expresa como:

$$\text{exactitud (\%)} = \frac{\bar{x}}{\mu} \times 100$$

donde:

- | | | |
|-----------|---|---|
| \bar{x} | = | media de los resultados obtenidos para la muestra de referencia |
| μ | = | valor “verdadero” dado para la muestra de referencia |

El sesgo puede expresarse como un valor absoluto por:

$$\text{sesgo} = \bar{x} - \mu$$

o, como un valor relativo por:

$$\text{sesgo (\%)} = \frac{\bar{x} - \mu}{\mu} \times 100$$

6 PRECISIÓN

Los análisis repetidos sobre una muestra de referencia permiten calcular, además de la exactitud y el sesgo, la desviación estándar de la media como una medida de la precisión.

Numéricamente, la precisión se expresa por el valor absoluto de la desviación estándar o, más universalmente, por la desviación estándar relativa (RSD) o por el coeficiente de variación (CV):

$$RSD = \frac{S}{\bar{x}}$$

$$CV (\%) = \frac{S}{\bar{x}} \times 100$$

donde:

s = desviación estándar de \bar{x}
 \bar{x} = media de los resultados obtenidos para la muestra de referencia

7 SENSIBILIDAD

La sensibilidad es una medida de la respuesta del instrumento o del método completo a la concentración del analito, es decir, es la pendiente del gráfico de calibración.

La sensibilidad para el analito en el extracto final de la muestra no necesariamente es igual a la sensibilidad para el analito en una solución estándar simple. La sensibilidad puede no ser constante en todo el rango, generalmente disminuye a mayores concentraciones.

En general, en cualquier punto del gráfico de calibración, la sensibilidad puede expresarse por:

$$S = \frac{\Delta y}{\Delta C}$$

donde:

S = sensibilidad
 Δy = cambio en la respuesta y debida a un ΔC
 ΔC = cambio en la concentración de analito

Las dimensiones de S dependen de las dimensiones de y y C . En espectrofotometría de absorción atómica, por ejemplo, S se expresa generalmente en unidades de absorbancia por mg/L.

En los gráficos de calibración lineales, del tipo $y = a + bx$, la pendiente b es la sensibilidad.

8 RANGO DE TRABAJO

Para la mayoría de los métodos, el rango de trabajo se conoce de experiencias previas. Cuando se introduce un método nuevo este rango debe determinarse, especialmente el límite superior del rango, ya que el límite inferior corresponde al límite de detección ya discutido.

Para determinar el rango de medición puede aplicarse el procedimiento siguiente:

- Preparar una solución estándar del analito en la matriz relevante (extractante) con una concentración más alta que la mayor esperada.
- Medir esta solución y anotar la respuesta
- Diluir la solución estándar 10x con la solución matriz y medir nuevamente.
- Repetir la dilución y medición hasta que el instrumento no responda.
- Dibujar el gráfico de calibración de la respuesta versus la concentración
- Estimar la parte útil del gráfico.

Si la dilución 10x es demasiado alta para obtener un gráfico adecuado, puede usarse por ej. 5x.

9 ESPECIFICIDAD

Un método analítico es específico cuando da una señal analítica exclusivamente para un componente particular pero no da señales para todos los otros componentes presentes en la muestra.

En aquellos casos en que la matriz de la muestra es variable, se recomienda que la especificidad se establezca para los diferentes tipos de matriz en forma independiente. La especificidad puede verificarse de diferentes maneras, dependiendo del tipo de análisis a realizar:

- Se prepara una solución estándar del analito con una concentración similar a la que se espera que tenga la solución de la muestra y se comparan las mediciones en ambas soluciones.
- Se prepara una solución estándar del analito con una concentración similar a la que se espera que tenga la solución de la muestra. Se fortifican ambas soluciones con una cantidad equivalente de la matriz y se comparan las mediciones de ambas soluciones.

- Se prepara una solución estándar del analito con una concentración similar a la que se espera que tenga la solución de la muestra. Se fortifican ambas soluciones con una cantidad equivalente de analito y se comparan las mediciones de ambas soluciones.

También pueden usarse soluciones, tanto de la muestra como del estándar, fortificadas con varias concentraciones de analito. Esto permite determinar el grado de interferencia, dependiendo de la concentración del analito a determinar. Estos datos pueden obtenerse del estudio de linealidad del método utilizando la adición estándar.

10 SELECTIVIDAD

Un método es selectivo cuando produce resultados analíticos correctos para varios componentes de una mezcla sin ninguna interacción mutua de los componentes.

En los informes de validación, la selectividad y la especificidad generalmente se describen, no se expresan cuantitativamente.

11 RECUPERACIÓN

La recuperación se define como *la fracción del analito determinada después de la adición de una cantidad conocida de analito a la muestra.*

En la práctica, las muestras de control son las más usadas para la adición de analito en una concentración generalmente equivalente al medio del rango de trabajo. Se analizan las muestras con y sin adición de analito al menos 10 veces y se calculan las medias y las desviaciones estándares. Con estos datos se puede calcular la repetibilidad (repeticiones en la misma tanda) y la reproducibilidad dentro del laboratorio (repeticiones en distintas tandas).

La recuperación se calcula como:

$$\text{Recuperación (\%)} = \frac{\bar{x}_+ - \bar{x}}{x_{\text{ag}}} \times 100$$

donde:

\bar{x}_+	=	media de los resultados de la muestra con adición de analito
\bar{x}	=	media de los resultados de la muestra
x_{ag}	=	cantidad agregada de analito

12 ROBUSTEZ

Un método analítico es robusto si los resultados no son muy sensibles a las variaciones en las condiciones experimentales. Tales condiciones experimentales pueden ser: temperatura, duración de la extracción o agitación, técnica de agitación, pH, pureza de los reactivos, contenido de humedad de la muestra, tamaño de la muestra, etc.

El método más conveniente para estimar la robustez es el denominado “diseño factorial parcial de Youden y Steiner”, el cual con sólo 8 repeticiones se pueden variar y analizar 7 factores. La matriz del diseño es la siguiente:

Experimento	Factores							Resultados
	A	B	C	D	E	F	G	
1	+	+	+	+	+	+	+	Y ₁
2	+	+	-	+	-	-	-	Y ₂
3	+	-	+	-	+	-	-	Y ₃
4	+	-	-	-	-	+	+	Y ₄
5	-	+	+	-	-	+	-	Y ₅
6	-	+	-	-	+	-	+	Y ₆
7	-	-	+	+	-	-	+	Y ₇
8	-	-	-	+	+	+	-	Y ₈

Las 8 submuestras se analizan básicamente según el procedimiento de operación del método y las variaciones se indican por los signos + o – que significan un nivel alto o bajo, la presencia o ausencia de un factor, u otras condiciones a investigar.

El efecto absoluto (sesgo) de cada factor A a G se puede calcular como sigue:

$$\text{Efecto}_A \text{ (absoluto)} = \frac{\sum Y_{A+} - \sum Y_{A-}}{4}$$

donde:

$\sum Y_{A+}$ = suma de los resultados Y_i donde el factor A tiene un signo +
($Y_1+Y_2+Y_3+Y_4$; $n=4$)

$\sum Y_{A-}$ = suma de los resultados Y_i donde el factor A tiene un signo -
($Y_5+Y_6+Y_7+Y_8$; $n=4$)

La prueba de significancia del efecto puede hacerse de dos maneras:

1. Con la prueba de t usando los valores críticos de tabla para dos colas con $n=4$. Cuando se espera que el efecto actúe en una sola dirección puede usarse la prueba para una cola.
2. Probando si el efecto excede la precisión del procedimiento original, es decir, si el efecto excede el ruido. Más práctico y real sería en este caso usar s_{gc} , desviación

estándar dentro del laboratorio tomada de los gráficos de control. La desviación estándar de la media de las mediciones puede asumirse como $s_{gc}/\sqrt{4}$ y la desviación estándar de la diferencia entre las dos medias (desviación estándar del efecto, s_E) como $s_E = \sqrt{2(s_{gc})^2}/\sqrt{4} = s_{gc}/\sqrt{2}$. El efecto puede considerarse significativo si excede 2 veces la desviación estándar del procedimiento, es decir, $(2 \times s_{gc}/\sqrt{2})$.

Por lo tanto, el efecto es significativo cuando:

$$\text{Efecto} > 1,4 \times s_{gc}$$

donde:

s_{gc} = desviación estándar del procedimiento original tomada del gráfico de control

No siempre es posible o deseable variar siete factores, pero el método descrito no permite una reducción de factores.

Para estudiar sólo tres factores se puede usar el siguiente diseño:

Experimento	Factores			Resultados
	A	B	C	
1	+	+	+	Y_1
2	-	+	-	Y_2
3	+	-	+	Y_3
4	-	-	-	Y_4

El efecto absoluto de los factores A, B y C puede calcularse como:

$$\text{Efecto}_A \text{ (absoluto)} = \frac{\sum Y_{A+} - \sum Y_{A-}}{2}$$

donde:

$\sum Y_{A+}$ = suma de los resultados Y_i donde el factor A tiene un signo + (Y_1+Y_3 ; $n=2$)

$\sum Y_{A-}$ = suma de los resultados Y_i donde el factor A tiene un signo - (Y_2+Y_4 ; $n=2$)

La prueba de significancia del efecto puede hacerse en forma similar a la descrita para siete factores, con la diferencia que aquí el $n=2$.

13 INTERFERENCIAS

Muchos métodos analíticos son susceptibles, en un mayor o menor grado, a interferencias de varios tipos. Una validación adecuada debería considerar tales influencias. Idealmente, las interferencias deben cuantificarse como sesgo y corregirse, pero a menudo esto es prácticamente imposible.

14 APLICABILIDAD

Cuando se propone un nuevo método o cuando se debe escoger un método para una determinación, puede ser útil una descripción de la facilidad o dificultad de su aplicación. Los problemas, en la mayoría de los casos, se relacionan con la disponibilidad y mantención de ciertos equipos y con los requerimientos de personal especializado. Si se conocen limitaciones de aplicabilidad del método, deben mencionarse en el informe de validación.

15 ADECUACIÓN AL PROPÓSITO

La adecuación al propósito es el grado en que el rendimiento de un método se ajusta a los criterios acordados entre el analista y el usuario final de los datos, que describen las necesidades del usuario final. Por ejemplo, los errores en los datos no deben ser de una magnitud que aumente la probabilidad definida de tomar decisiones incorrectas a partir de ellos, pero no deben ser tan pequeños como para que las pruebas resulten ser un gasto inútil para el usuario final.

16 BIBLIOGRAFÍA

- Acevedo L., A. 1993. Laboratorios analíticos. Cómo garantizar la calidad. Editorial Universitaria, Santiago, Chile. 159 p.
- ISO 5725-1. 1994. Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results. Part 1: General principles and definitions. 17 p.
- ISO 5725-1. 1994. Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results. Part 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method. 42 p.
- NCh 2725. 2002. Directrices para la aplicación de NCh-ISO 17025 en los laboratorios que realizan ensayos y análisis químicos. Instituto Nacional de Normalización, Santiago, Chile, 61 p.

- NCh 2737. 2002. Procedimiento para la calibración de medidores de pH. Instituto Nacional de Normalización, Santiago, Chile, 19 p.
- NCh 2755/1. 2003. Guía para la cuantificación y expresión de la incertidumbre en el análisis químico. Parte 1: Fundamentos. Instituto Nacional de Normalización, Santiago, Chile, 81 p.
- NCh 2766. 2003. Química. Estructura y contenido de las normas. Método de análisis químico. Instituto Nacional de Normalización, Santiago, Chile, 24 p.
- NCh-ISO 10013. 1994. Guía para desarrollar manuales de calidad. Instituto Nacional de Normalización, Santiago, Chile, 14 p.
- NCh-ISO 17025. 2000. Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración. 38 p.
- Ríos C., A. 1999. Curso sobre validación de métodos. III Simposio y Exposición de la Sección de América Latina y el Caribe de la AOAC Internacional, Comisión Chilena de Energía Nuclear, Santiago, Chile, 17 p.
- Van Reeuwijk, L.P. 1998. Guidelines for quality management in soil and plant laboratories. FAO and ISRIC, FAO Soils Bulletin 74, Rome, Italy. 143 p.