

VALIDACION DE METODOS

1. [El proceso analítico](#)
 - 1.1. Definición del problema
 - 1.2. Etapas del proceso
2. [El método analítico](#)
 - 2.1. Definiciones
 - 2.2. Trazabilidad
 - 2.3. Caracterización de un método analítico
3. [Calidad y objetivos de la Química Analítica](#)
 - 3.1. Definiciones
 - 3.2. Calidad de los datos analíticos
4. [Validación del método analítico](#)
 - 4.1. Definición
 - 4.2. Validación del método analítico
 - 4.2.1. Validación de la instrumentación
 - 4.2.2. Revisión bibliográfica
 - 4.2.3. Validación del método analítico
 - 4.2.4. Validación de la etapa de detección
 - 4.2.5. Efectos de matriz
 - 4.2.6. Muestras sólidas
 - 4.2.7. Robustez
 - 4.2.8. Puntos y gráficos de control
 - 4.2.9. Materiales de referencia
 - 4.2.10. Buenas prácticas de laboratorio (GLP)
 - 4.2.11. Normalización
5. [Métodos de validación interna](#)
 - 5.1. Reglas de oro de la validación
 - 5.2. Tipos de validación interna
 - 5.3. Precisión
 - 5.3.1. Terminología
 - 5.3.2. Formas de estimar la precisión
 - 5.4. Exactitud y bias
 - 5.4.1. Terminología
 - 5.4.2. Formas de estimar los bias
 - 5.5. Linealidad de curvas de calibrado
 - 5.6. Límite de detección y cantidades relacionadas
 - 5.6.1. Límite de decisión
 - 5.6.2. Límite de detección
 - 5.6.3. Límite de cuantificación
 - 5.6.4. Determinación del blanco
 - 5.6.5. Límites de concentración
 - 5.7. Sensibilidad
 - 5.8. Selectividad e interferencias
6. [Métodos de validación externa](#)
 - 6.1. Tipos de estudios
 - 6.2. Comparación de métodos
 - 6.2.1. Definiciones
 - 6.2.2. Tipos de experimentos
 - 6.2.3. Repetitividad y reproducibilidad
 - 6.2.4. Análisis estadístico
 - 6.3. Comparación de laboratorios
 - 6.3.1. Métodos visuales
 - 6.3.2. Métodos de rango
 - 6.3.3. Método de z
7. [Bibliografía](#)

1 EL PROCESO ANALÍTICO

El análisis de una muestra debe ser llevado a cabo con un objetivo claro, que en muchos casos es formulado por otros. En ocasiones, el problema no aparece inicialmente en términos analíticos, y debe ser reformulado por el analista. Se dispone de tantos procedimientos, y existen tantas matrices, que el problema debe estar claramente explicitado antes de comenzar.

En muchos casos se requiere una aproximación multidisciplinaria. Puede que ni el cliente ni el analista solos comprendan todas las implicaciones del problema. Es preciso una gran interacción.

1.1 Definición del problema

Hay que definir qué es lo que **debería** analizarse y lo que **puede** ser analizado. Deben resolverse una serie de cuestiones:

- ¿Cuál es la naturaleza del objeto o muestra?. ¿Interesa su composición elemental o molecular o la presencia de grupos funcionales?
- ¿Se precisa un análisis cualitativo o cuantitativo?
- ¿Cuánto material hay disponible y cuál es el nivel de concentraciones del analito?
- ¿Cuál es la matriz de la muestra?
- ¿Se precisa un análisis multicomponente o no?
- ¿Cuál es la demora de tiempo existente y la aceptable?
- ¿Hay posibilidad de obtener muchas muestras o una sola?
- ¿Se precisa un sistema automático o en línea?
- ¿Hay problemas monetarios?
- ¿Puede destruirse la muestra?

1.2 Etapas del proceso

Selección del procedimiento

Importancia crucial, ya que determina el coste en instrumental y personal. Viene influido por el tamaño y tipo de muestra, la disponibilidad temporal y la información que desea obtenerse

Muestreo

La veracidad y la calidad del resultado final vienen afectadas por la calidad de la muestra y su representatividad.

Transporte y almacenamiento

Debe evitarse el que se produzcan cambios en la muestra con posterioridad al muestreo. En todo caso deben tenerse en consideración las posibles alteraciones.

Preparación de la muestra

Consiste en adaptar el estado de la muestra al aceptable por la técnica analítica a utilizar. Debe tratarse de que esa manipulación sea mínima. Depende en gran manera de la técnica a utilizar.

Medida

En nuestro caso, es la comparación de la señal originada por la muestra con la producida por una serie de patrones de composición conocida. Deben tenerse en cuenta las fluctuaciones o ruido del instrumento empleado y optimizar la relación Señal/Ruido

Evaluación de datos

Muchas de las técnicas instrumentales están más o menos computerizadas. Debe evaluarse cuidadosamente el software ya que en ocasiones el analista no tiene acceso a los datos originales. Si la técnica no resulta adecuada (p.e. las muestras están fuera del rango de aplicación), debe ser sustituida.

Conclusiones e Informe

El analista es el **responsable** final de los datos analíticos que reporta. Debe indicarse claramente la fiabilidad de los resultados así como evitar ambigüedades. Hay que tener en cuenta que los resultados influirán sobre el problema global definido por el cliente.

Vemos a continuación un ejemplo en el cual se plantea un problema derivado de los lixiviados de un vertedero de residuos a un acuífero.

El Proceso analítico

<i>Etapas</i>	<i>Interacción</i>	<i>Ejemplo</i>
Definición general del problema	Cliente	Vertido procedente de los lixiviados de un vertedero
Definición analítica del problema y definición del objetivo	Cliente ↔ Analista	Cuán contaminado está el acuífero
Selección del procedimiento	Analista	Determinación de los metales pesados en agua subterránea
Muestreo	Cliente + Analista	Inventario de puntos Elección de los más adecuados Plan de muestreo
Transporte y almacenamiento	(Cliente +) Analista	Cámara frigorífica y acidificación
Preparación de la muestra	Analista	Filtración a 0,45 µm
Medida	Analista	Determinación por ETAAS
Evaluación de datos	Analista	Cuantificación de los contenidos
Conclusiones	Analista	Están los valores dentro de los habituales del método
Informe	Analista ↔ Cliente	Recomendaciones para seguimiento y remedio del problema

2. EL METODO ANALITICO

El método analítico es la forma en que el analista obtiene la información. Debe estar totalmente adaptado a los propósitos requeridos. Por tanto, el analista o el químico analítico debe seleccionar un método analítico adecuado y debe identificar todas las posibles fuentes de error que afecten a su comportamiento.

2.1 Definiciones

El método se selecciona una vez conocido el problema analítico. Si es la primera vez, debe hacerse una revisión bibliográfica. La experiencia propia y ajena es de gran interés.

La clave consiste en convertir al analito de la muestra en una forma que sea compatible con la técnica o método de análisis elegida. Todos los pasos del método deben ser analizados y validados de forma que se obtengan datos que resulten precisos y veraces.

Existen diferentes tipos de métodos

Método oficial: Método requerido por ley o por una regulación dada por una agencia oficial (EPA, Directivas Europeas...)

Método de referencia o patrones de consenso: Métodos desarrollados por organismos que utilizan estudios interlaboratorios para validarlos.

Método modificado: Método patrón o de referencia modificado para adaptarlo a las condiciones actuales o a otro tipo de muestras.

Método rápido: Método para la determinación rápida de gran número de muestras

Método de rutina: Método utilizado rutinariamente en la práctica diaria. Pueden ser oficiales o de referencia.

Método automatizado: Método que emplea equipo automatizado

Método definitivo: Método de elevado nivel científico aplicado en un laboratorio reconocido por su gran calidad

La ISO clasifica los métodos sobre la base del calibrado

Calibrado o calibración: Conjunto de operaciones que establecen, bajo condiciones específicas, la relación entre los valores indicados por un instrumento o sistema de medida, y los correspondientes valores conocidos de un mesurando.

Métodos calculables (absolutos)

Origina el resultado llevando a cabo un cálculo definido sobre la base de las leyes que rigen los parámetros físicos y químicos implicados, utilizando medidas tomadas durante el análisis como: peso de muestra, volumen de reactivo, peso de precipitado, cantidad de electricidad, etc.

Métodos relativos

Compara la muestra analizada con un conjunto de muestras de calibración con contenido conocido, utilizando la respuesta (idealmente lineal) de un sistema de detección. El valor de la muestra se determina por interpolación. Estos métodos son poco sensibles a diferencias entre las muestras y los patrones de calibrado.

Métodos comparativos

Análogos a los anteriores, pero sensibles a diferencia de matriz. Son métodos rápidos que deben calibrarse con Material de Referencia Certificado (**MRC**) o con un Material de Referencia (**MR**).

Las tres categorías difieren en la forma en que se establece la concentración de la muestra, es decir en la forma en que está ligada la señal de la sustancia en la muestra con la señal de la sustancia en el conjunto de calibrado.

2.2 Trazabilidad

Este vínculo puede establecerse directamente con una cantidad de sustancia de estequiometría y pureza conocidas para métodos calculables y relativos, o con un MRC o MR para los comparativos. El vínculo, si transcurre a través de una cadena ininterrumpida hasta los adecuados patrones, se denomina trazabilidad que se define como:

Posibilidad o habilidad de trazar la historia, aplicación o localización de un elemento o actividad por medio de una identificación registrada.

Todos los pasos del procedimiento analítico deben llevarse a cabo y anotarse de forma que se registre toda la información esencial y no se introduzca información equivocada.

En otras palabras, los resultados de la determinación y no solo la medida final, deben estar ligados a través de una **cadena ininterrumpida** de comparaciones hasta los adecuados patrones de medida, generalmente patrones nacionales o internacionales (p.e unidades básicas del SI, constantes, MRC). Este vínculo debe ser **demostrable**.

2.3 Caracterización de un método analítico

Existen diferentes criterios, que pueden resumirse en la siguiente tabla

<i>Criterios relativos a la calidad del resultado analítico</i>	<i>Criterios relativos a aspectos económicos</i>
PRIMARIOS	
Precisión	
Bias, Exactitud y/o veracidad	Inversión a realizar
Límite de detección	Duración del análisis
SECUNDARIOS	Precauciones de seguridad
Linealidad	Instalaciones y mantenimiento
Intervalo de utilización	entrenamiento del personal
Límite de cuantificación	Eliminación de muestras
Selectividad	Costes de reactivos
Sensibilidad	
Robustez (Ruggedness)	

No hay acuerdo en la definición de muchos de los términos, y la ISO, IUPAC, AOAC, BCR (MTP) dan diferentes versiones. En general las definiciones más usuales son las siguientes (a lo largo del tema aparecerán de nuevo)

Precisión: Medida de la dispersión de las medidas alrededor de la media

Bias: Errores sistemáticos causados por el método y/o el laboratorio

Exactitud: Término impreciso. Antes relacionado con la falta de bias. Ahora la ISO lo define de otra forma

Límite de detección: Mínima concentración de analito que puede diferenciarse del fondo. Señal igual a k veces la desviación típica del fondo. Habitualmente $k=3$.

Linealidad: Propiedad de la línea de calibrado.

Límite de cuantificación: Mínima concentración de analito que puede determinarse con la suficiente precisión y exactitud. Señal iguala a $k=10$ veces la desviación típica del fondo

Intervalo de utilización: Rango de concentraciones entre los que se puede utilizar la línea de calibrado.

Sensibilidad: $S = d(\text{Señal}) / d(\text{concentración})$

Selectividad: Indica como afecta la presencia de otros componentes de la muestra. El término especificidad debe ser evitado

Robustez: Indica como afecta al resultado la variación de algunos parámetros operacionales

3. CALIDAD Y OBJETIVOS DE LA QUIMICA ANALITICA

3.1 Definiciones

Los resultados procedentes de un análisis o resultados analíticos son de gran importancia a la hora de tomar decisiones en diversas esferas humanas: medio ambiente, alimentos, medicinas, industria, etc. Se ha estimado que al menos un 5% del P.I.B. de los países desarrollados se dedican a llevar a cabo determinaciones analíticas.

Por ello, resulta fundamental no sólo resaltar la importancia de las medidas químicas, sino también la necesidad de garantizar su calidad. Se hace uso de lo que la ISO define como

Quality Assurance (QA): Acciones planificadas y sistemáticas necesarias para proporcionar la confianza de que un producto, proceso o servicio satisface los requisitos de calidad fijados.

Calidad: La totalidad de las características y propiedades de un producto de un servicio o producto que permiten que satisfaga necesidades implícitas o fijadas.

Control de calidad: Técnicas y actividades operacionales que se emplean para cumplir los requisitos de calidad.

Sistema de Calidad: Organización estructural, responsabilidades, procedimientos y recursos para implementar la calidad.

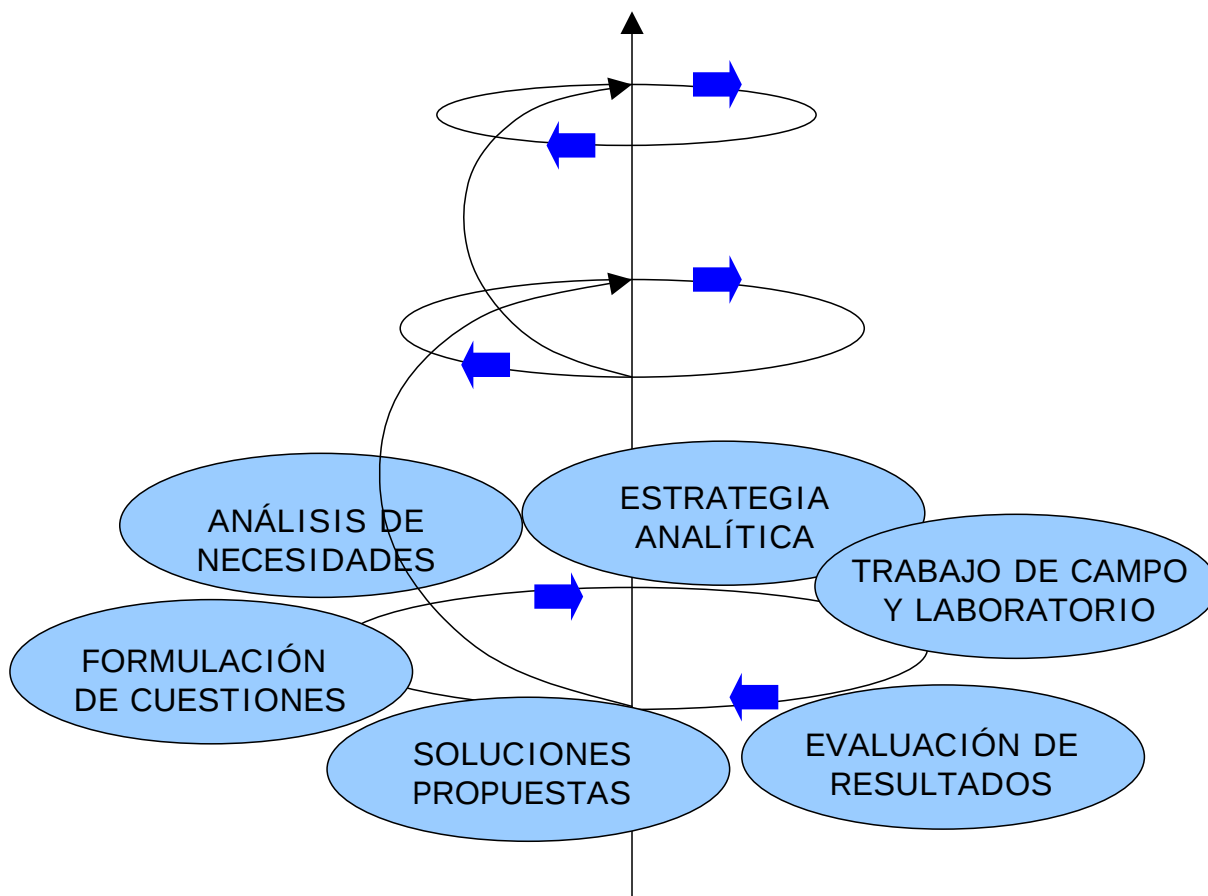
Organización (management) de Calidad: Aspectos organizativos que determinan e implementan la política de calidad

Política de Calidad: Decisiones de alto nivel relativas a las intenciones y directrices sobre la calidad global

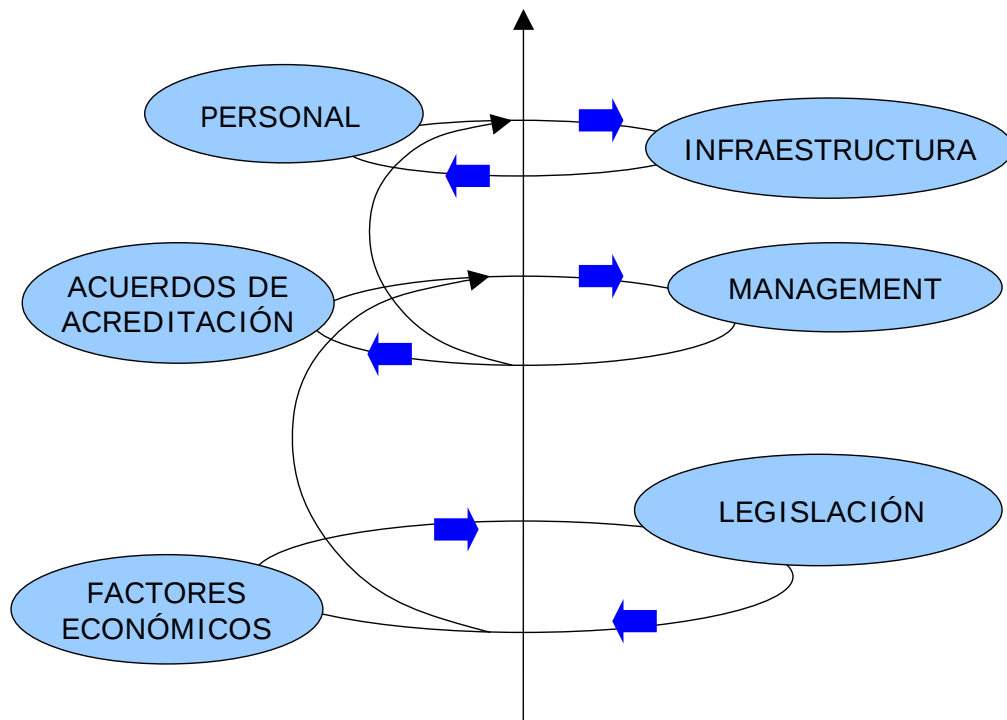
3.2 Calidad de los datos analíticos

La Calidad del servicio prestado por un analista puede lograrse si el analista y el cliente interaccionan en busca de la respuesta solicitada. Para ello se hace uso de la **espiral de calidad**. Si al final del círculo no se obtiene una respuesta satisfactoria, el proceso se repite una vez más. El número de círculos debe ser pequeño por razones económicas.

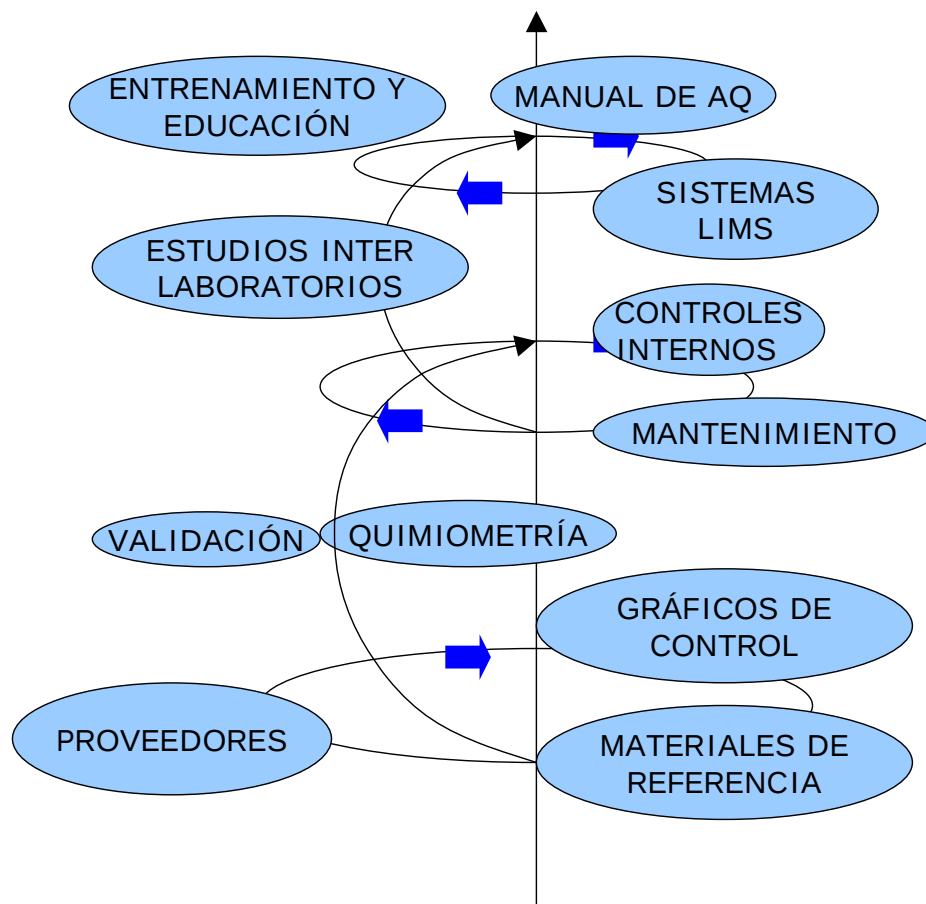
Por tanto el analista o el químico analítico no debe limitarse a originar resultados sino que debe participar en la formulación de preguntas y respuestas.



Espiral del control de calidad y de AQ en el caso del análisis químico



Parámetros que influyen sobre la espiral de calidad



Herramientas disponibles para el control de calidad en laboratorios de análisis

4. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

4.1 Definición

Validación de un método analítico es el proceso que permite demostrar que los resultados producidos por el mismo son fiables y reproducibles, y que el método es adecuado para la aplicación sobre la que se emplea. Se trata de **documentar** la calidad del procedimiento analítico determinando sus características (performance) sobre la base de criterios tales como la exactitud, precisión, límite de detección, etc.

Este proceso obliga a que el analista investigue **todas las posibles fuentes de error** y las elimine. De esta forma demostrará que el método origina resultados que pueden ser trazados hasta las referencias elegidas. Esto se consigue solo con estructuras adaptadas, personal entrenado y motivado y con instrumentos adaptados y convenientemente mantenidos.

4.2. Puntos de interés general

4.2.1 Validación de la instrumentación

Debe ser siempre anterior a la validación del método. Deben verificarse las especificaciones proporcionadas por el proveedor o el fabricante de los equipos: comportamiento, sensibilidad, estabilidad, rangos de linealidad, etc.

4.2.2 Revisión bibliográfica

Hay muy pocos métodos analíticos que estén lo suficientemente detallados y validados como para poder ser aplicados directamente sin riesgos. El analista debería validarlos todos sobre sus propias muestras. La transferencia de métodos de un tipo de muestra a otro no puede llevarse a cabo. La revisión bibliográfica puede indicar cuál es el mejor método pero nada más.

4.2.3 Validación del método analítico

En análisis químico raras veces puede medirse directamente la propiedad de interés (p.e. el contenido en metales pesados en una muestra de mejillones). En vez de eso, se debe elegir una muestra representativa y convertir o separar el analito en una forma compatible con el detector empleado. Por tanto hay que cambiar la estructura física y/o química de la muestra, sin perder el control de manera que no se rompa la trazabilidad de la detección final hasta una referencia predeterminada.

Alguno de los pasos clásicos puede eliminarse, pero cada uno de ellos es una fuente potencial de error que se añade a la incertidumbre total de la determinación. Esas fuentes deben eliminarse o minimizarse.

Una estrategia consiste en estudiar el procedimiento analítico **hacia atrás**, estudiando primero el sistema más sencillo (p.e. las disoluciones empleadas en el calibrado), y después paso a paso hasta la muestra real. Después de cada paso el analista debe evaluar si las conclusiones extraídas en el paso anterior siguen siendo válidas. Los errores aleatorios pueden ser detectados y minimizados mediante medidas intra-laboratorio. Los errores sistemáticos (bias) pueden ser detectados y eliminados mediante medidas internas (uso de MRC) o externas (ejercicios de comparación inter-laboratorios).

También debe evaluarse la robustez del procedimiento: Propiedad de ser relativamente insensible a cambios pequeños del procedimiento: p.e. calidad de los reactivos, cambio de analista, condiciones ambientales, etc.

Los métodos patrón o estandarizados son de validación sencilla. En este caso basta con evaluar la precisión, verificar la veracidad, e investigar la sensibilidad y la robustez. Si por el contrario el método ha sido desarrollado por el propio analista o en su laboratorio, debe llevarse a cabo un proceso total de validación. Consiste en dividir el proceso en las partes generales indicadas, demostrar que no hay errores sistemáticos e investigar la contribución de los diferentes pasos a la incertidumbre total.

4.2.4 Validación de la etapa de detección final

Los errores en la etapa de calibrado son muy frecuentes. Incluyen:

- Errores en cálculos sencillos (p.e. concentraciones)

- Errores de dilución
- Confusiones originadas al utilizar disolventes
- Utilización de compuestos impurificados
- Contaminaciones, interferencias, patrones inadecuados
- Corrección de fondo mal hecha o confianza ciega en sistemas de integración
- Mal uso de unidades: 1 g no equivale a 1 mL, confusión en el uso de ppm, ppb, ppt...
- Ausencia de igualación de matriz de las disoluciones de calibrado

Deben prepararse disoluciones con concentración exactamente conocida en el analito (utilización de las adecuadas sustancias patrón). Estas disoluciones (o sus madres) deben almacenarse en adecuadas condiciones y ser manejadas con cuidado para no ser contaminadas. Deben ser reemplazadas de forma regular.

Los errores durante la calibración pueden originar diferencias entre laboratorios de hasta varios órdenes de magnitud.

4.2.5 Influencia de la matriz

En este paso, se adicionan los otros componentes de la muestra que acompañan al analito. Este paso es importante en técnicas multielementales, como pueden ser el ICP o la cromatografía, o en el caso de muestras que precisen de pretratamiento (p.e. mineralización). Después de investigar el efecto de matriz, debe comprobarse que las conclusiones obtenidas en el paso anterior se mantienen.

4.2.6 Muestras sólidas

Este paso no es necesario si la muestra está originalmente en estado líquido. Pero si ese no es el caso, esta etapa es muy crítica. Deben optimizarse procedimientos de extracción y digestión. En análisis inorgánico el paso de digestión puede validarse con una técnica que permita medir los elementos directamente en la matriz (p.e. Activación Neutrónica).

Para análisis orgánico la validación de la extracción es difícil e insatisfactoria. En el caso de sólidos es casi imposible demostrar que todos los compuestos han sido extraídos.

4.2.7 Robustez del método

Las variaciones pequeñas de los parámetros operacionales del procedimiento no deben afectar a su comportamiento. P.e.

- Variaciones de temperatura o humedad
- Cambios en el equipo (Soxhlet, reactores...)
- Cambio de analista
- Variaciones en la matriz de la muestra

Un método demasiado sensible a las variaciones no puede ser empleado

4.2.8 Puntos y gráficos de control

Una vez validados todos los pasos, se pueden definir unos puntos de control que permitan comprobar el comportamiento del método durante su uso diario. Estos puntos deben estar ligados a pasos sensibles detectados durante la validación. Los resultados de estos puntos deben registrarse de manera que los problemas puedan ser detectados y seguidos.

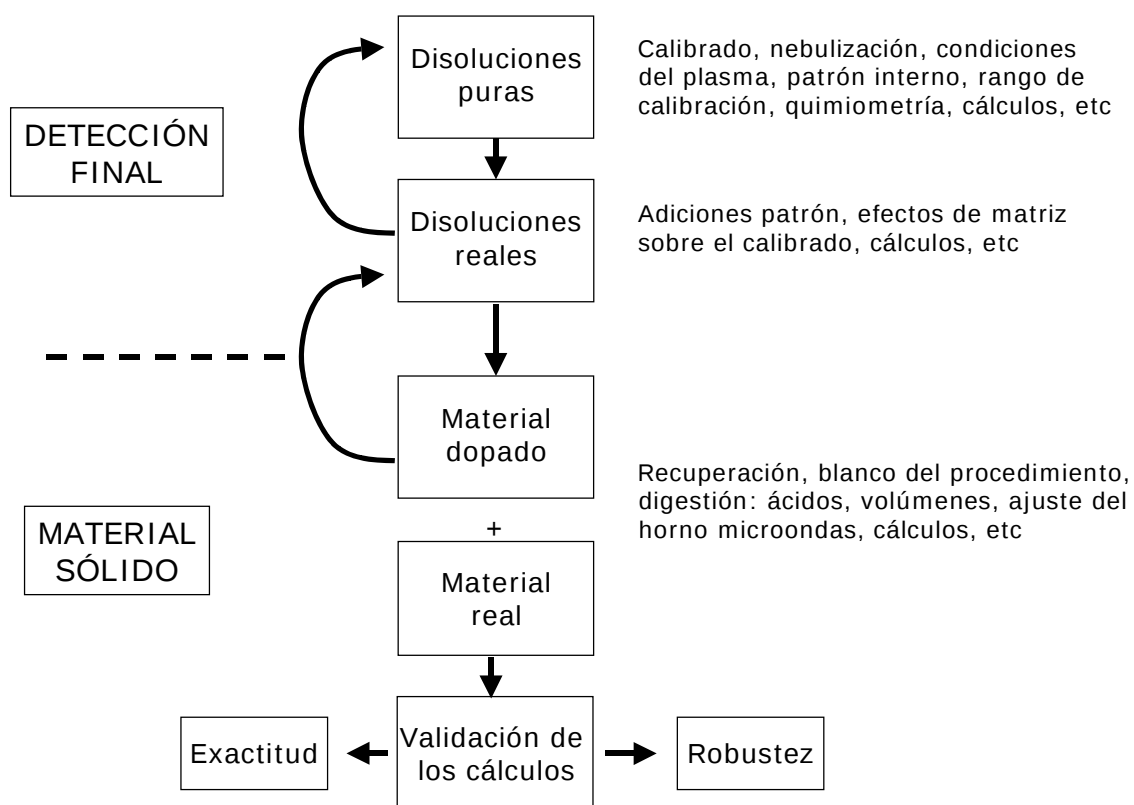
Finalizada la validación, puede comprobarse el comportamiento del método analizando a intervalos regulares de tiempo un MCR. Si el laboratorio trabaja con un nivel de calidad constante y elevado, las fluctuaciones del resultado deben ser pequeñas.

Los gráficos de control permiten la detección de nuevos errores sistemáticos y el seguimiento de la precisión si se hacen medidas replicadas. Al comienzo del gráfico, se debe determinar a partir de medidas replicadas el valor medio y la desviación típica del método. De esa forma se pueden definir niveles de "aviso" (warning) y "alarma".

El sobrepasar una vez el nivel de aviso indica que algo puede ir mal. Si el aviso se repite dos veces debe investigarse (p.e. un nuevo error sistemático). El nivel de alarma puede implicar tener que revalidar completamente el procedimiento.

Los gráficos más empleados son los de X y los de R

Las herramientas de la Quimiometría (Ciencia que relaciona las medidas hechas sobre un sistema o proceso químico con el estado del sistema por medio de la aplicación de métodos estadísticos y matemáticos) son de aplicación en todos los pasos de la validación, desde la calibración a la comparación con otros métodos.



Ejemplo de validación de la determinación de Cd y Pb en muestras alimentarias

4.2.9. Materiales de referencia certificados

Material de Referencia: Material o sustancia, una o más de cuyas propiedades son suficientemente homogéneas y bien establecidas, como para ser utilizado para calibrar un equipo, comprobar un método de medida o para asignar valores a materiales

Material de Referencia Certificado: Material de Referencia, acompañado de un certificado, uno o más de cuyas propiedades están certificadas por un procedimiento. Este procedimiento permite establecer la trazabilidad del material en términos de unidades SI en los cuales se expresan los valores de esas propiedades (p.e. el mol como unidad SI de cantidad de materia). Cada valor certificado se acompaña de su incertidumbre a un nivel de confianza dado.

Tipos de materiales de referencia certificados (MRC)

- Sustancias o disoluciones puras para calibración e identificación
- Materiales de matriz conocida para calibración de métodos comparativos
- Materiales de matriz lo más parecida posible a la analizada por el usuario
- Materiales de referencia definidos metodológicamente p.e. biodisponibilidad, lixiviables...
Implican un protocolo muy estricto

Las sustancias o disoluciones puras llevan certificadas la máxima concentración de impurezas. Se basan en procedimientos de pesada y en comprobaciones estequiométricas. Los MRC de matriz suelen ser sustancias de origen natural lo más parecidas a muestras reales. La utilización de muestras artificiales o naturales enriquecidas artificialmente (dopados o en inglés spiked) puede ser peligrosa.

Los MRC se emplean principalmente para demostrar la exactitud con que un método analítico se aplica en un laboratorio, así demostrar la trazabilidad de los resultados, primero al MRC y luego a las unidades en que se certifica su contenido.

4.2.10 Buenas prácticas de laboratorio (GLP)

Desarrolladas en 1978 por la US Food and Drug Administration. Hoy día propuestas por otros muchos organismos. Las GLP están relacionadas con los procesos organizativos y las condiciones bajo las que los estudios de laboratorios se planifican, se llevan a cabo, se siguen, se registran y se comunican. Se trata de que toda la información sea trazable y pueda ser encontrada.

De todas maneras, las GLP solas no garantizan la exactitud de los resultados reales.

4.2.11 Normalización

Sistemas de acreditación

Dependiendo del campo de actividad (alimentos, medio ambiente, biomédico) los sistemas de control toman la forma de inspecciones administrativas, ensayos de "proficiency" o ambos. En Europa se han desarrollado las normas EN 45000 para estudio de laboratorios, o EN 29000 para actividades industriales. Se ha desarrollado un sistema de reconocimiento mutuo entre los sistemas de acreditación de los diferentes países. Esos sistemas son aplicados no solo por países de la UE sino por otros europeos (European Cooperation for Accreditation of Laboratories EAL). En países no europeos existen organismos similares: NATA en Australia, A2LA en USA.... A nivel mundial existe la International Laboratory Accreditation Cooperation (ILAC). Otros organismos como la IUPAC o la AOAC también contribuyen.

Normas escritas

Son una manera de definir y promover los requisitos para la calidad y para mejorar la comparación de resultados analíticos. Estas normas son también un primer paso para la introducción de requisitos mínimos de calidad y comparación en sistemas regulatorios.

En ocasiones quedan fuera de las últimas tendencias analíticas (state of the art) pero deben ser aplicados por razones legales. La aplicación de una norma no garantiza que no se cometan errores. Las diferencias pueden deberse a errores sistemáticos, mala aplicación de la norma o porque ésta última esté mal descrita o mal fraseada.

Organismos normalizadores

Los hay de nivel nacional e internacional. En países europeos (UE o y EFTA) el organismo es el CEN/CENELEC/ETSI que promueve normas que van reemplazando poco a poco a las normas nacionales. A nivel mundial, el organismo central es el ISO, con cientos de comités técnicos.

El proceso de adopción de nuevas normas es muy lento (varios años) sobre todo para normas internacionales. Su coste es muy elevado y está respaldado por organismos públicos.

5. MÉTODOS DE VALIDACIÓN INTERNA

5.1 Reglas de oro de la validación

- 1) Hay que validar el método completo: Etapa de medida y pretratamiento. A veces el muestreo y almacenamiento
- 2) Hay que validar todo el rango de concentraciones
- 3) Hay que validar todo el rango de matrices analíticas

5.2 Tipos de validación interna

Validación prospectiva: Se usa con métodos nuevos. Se divide en Validación exploratoria donde se estudian los pasos más críticos y Validación completa que tiene en cuenta el contexto en que se usará el método

Chequeos de adecuación (Suitability checks): Se usan para transferir un método de un laboratorio a otro. Se eliminaron los bias del método pero no los del laboratorio. Se emplean al trabajar bajo las Buenas Prácticas de Laboratorio (GLP) y debe ser especificado en el Procedimiento Operativo Estándar (SOP)

Validación retrospectiva: Se estudian los resultados a lo largo del tiempo

Control de calidad: Se emplean a ciegas muestras de composición conocida

El tipo de validación dependerá del laboratorio y de su actividad fundamental:

- 1) El laboratorio desarrolla sus propios métodos. Debe hacer una validación completa de todos los criterios y que sus métodos estén disponibles para organismos de control. Debe desarrollar chequeos de adecuación
- 2) El laboratorio desarrolla nuevos métodos de uso general. Debe hacer lo anterior y además participar en estudios interlaboratorios de comprobación de métodos
- 3) El laboratorio usa métodos estándar. Debe comprobar su habilidad, analizando materiales de referencia y participando en estudios interlaboratorios de comprobación de laboratorios

5.3. Precisión

5.3.1 Terminología

Medida de los errores aleatorios. Mide la dispersión alrededor de la media

Repetitividad (Repeatability) es la cercanía entre sí de las medidas obtenidas con el mismo método, sobre idéntico material o muestra, en las mismas condiciones (operador, laboratorio, instrumental...) y en un intervalo de tiempo pequeño. Solo puede medirse dentro del laboratorio

Reproducibilidad (Reproducibility) es la cercanía entre sí de las medidas obtenidas por el mismo método sobre idéntico material, bajo condiciones diferentes. Solo puede medirse en estudios interlaboratorios

Se refieren a lo mismo, pero la Repetitividad se define en condiciones homogéneas y la Reproducibilidad en heterogéneas.

Robustez (Ruggedness) mide las alteraciones producidas por pequeñas variaciones en los valores nominales de los parámetros del método

5.3.2 Formas de estimar la precisión

Repetitividad

Se hacen de 6 a 8 determinaciones replicadas de una sola vez y por el mismo analista

Se calcula la Desviación Típica Relativa

Si el blanco es una fuente de variación también se analiza

Debe realizarse a varios niveles de concentraciones

A veces se compara la repetitividad de un método con la de otro de referencia. Se hace una prueba F de dos colas (H_0 : varianzas idénticas; H_1 : varianzas diferentes)

Reproducibilidad intermedia (dentro del laboratorio)

Se analiza una o varias réplicas a lo largo de varios días (de 5 a 8)

Con los resultados se hace un ANOVA y se calcula la varianza dentro de días (análoga a la repetitividad) y la varianza entre días o reproducibilidad dentro del laboratorio

Requerimientos para la precisión

Depende de a qué se aplique el método. Se suelen aceptar valores desde el 1% al 15 % de DTR.

Robustez

No hay definición. Fue introducida en Q.A. por Youden y Steiner.

Se definen niveles de los parámetros y se hacen diseños fraccionales saturados o diseños de Plackett-Burmann.

5.4 Exactitud (veracidad) y bias

5.4.1 Terminología

Los errores sistemáticos se caracterizan con términos tales como veracidad y bias y están relacionados con el término exactitud. No hay acuerdo con los términos e incluso las mismas organizaciones mantienen definiciones contradictorias.

Para la ISO bias y veracidad son la misma cosa y el bias es la medida cuantitativa de la veracidad (trueness). La veracidad es la concordancia entre el valor medio de una gran serie de medidas y el valor aceptado como referencia. La exactitud es la cercanía entre un resultado (test result), que puede ser la media de una serie de medidas, y el valor aceptado como referencia. La diferencia entre exactitud y veracidad para la ISO es simplemente el número de series independientes de determinaciones que se llevan a cabo.

La IUPAC define el bias igual, pero no reconoce la veracidad sino solo la exactitud. La AOAC es aún más compleja. Esta falta de acuerdo se resume en una frase de la ISO: *"accuracy was at one time used to cover only the component now named trueness"*. (Para una explicación más larga véase la Lección 2).

Mientras se aclara la cuestión Massart y col. Proponen como bias:

$$\text{Bias: } \Delta = \mu - \mu_0$$

donde μ es la media de la población de los resultados experimentales y μ_0 el valor verdadero.

Como μ no se conoce, sino sólo $\bar{x}$, es mejor definir $D = \bar{x} - \mu_0$

Hay dos componentes del bias:

Bias del método: Diferencia entre la esperanza de los resultados de todos los laboratorios que usan ese método y el valor aceptado de referencia

Bias del laboratorio: Diferencia entre la media de un gran número de resultados de un laboratorio y el valor medio global obtenido por todos los laboratorios

Bias del laboratorio = Bias del método + componente del bias del laboratorio concreto

El componente del bias del laboratorio concreto puede ser parte del error sistemático o del aleatorio. Desde el punto de vista del laboratorio individual ese componente es sistemático, pero al considerar varios laboratorios ese componente es aleatorio

Para evitar ambigüedades la ISO define el término incertidumbre (uncertainty): Un estimador añadido a un resultado que caracteriza el rango de valores dentro de los cuales se afirma que está el valor verdadero.

Los errores sistemáticos pueden ser constantes (absolutos) o proporcionales (relativos) según sea independiente o no de la concentración de analito. Las fuentes principales de errores constantes son: Selectividad insuficiente y la inadecuada corrección del blanco. Para los relativos: errores en el calibrado (diferentes pendientes) o el suponer incorrectamente la linealidad de la curva de calibrado.

5.4.2 Formas de estimar los bias

Rango de concentraciones restringido y reconstrucción de la muestra posible

Cuando las muestras son muy similares en concentración. Se reconstruye la muestra totalmente o se dopa o (spike) con analito un blanco.

Se analizan varias réplicas a cada nivel de concentraciones y se compara la media con el valor verdadero. Se hacen mediante una prueba t de dos colas y n-1 g.d.l.. $H_0: \bar{X} = \mu_0$; $H_1: \bar{X} \neq \mu_0$

Rango de concentraciones restringido y material de referencia disponible

Cuando las muestras son muy similares en concentración. Este procedimiento debe hacerse siempre de forma exploratoria. Se analizan varias réplicas a cada nivel de concentraciones y se compara la media con el valor certificado

El problema es que no se conoce μ_0 (sólo su estimación $\bar{X}_0$) ni sus g.d.l. No puede hacerse directamente mediante una prueba t de dos colas de comparación de medias, sino que

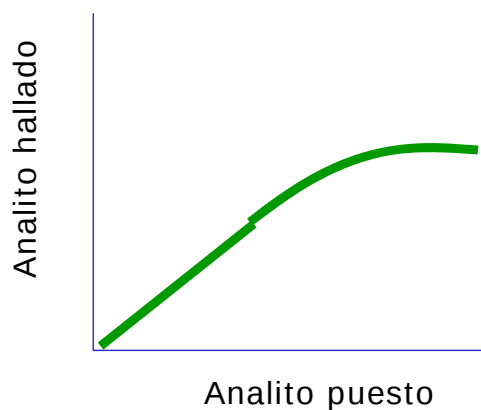
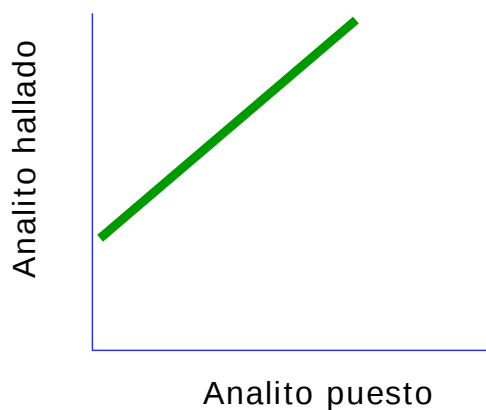
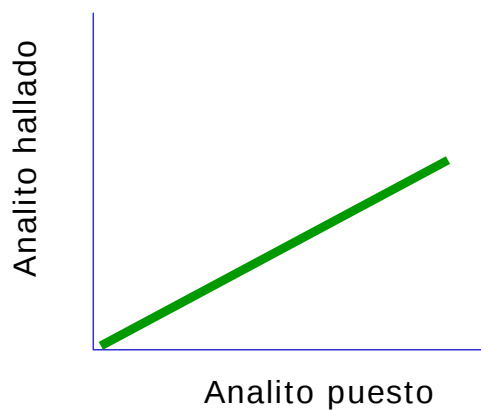
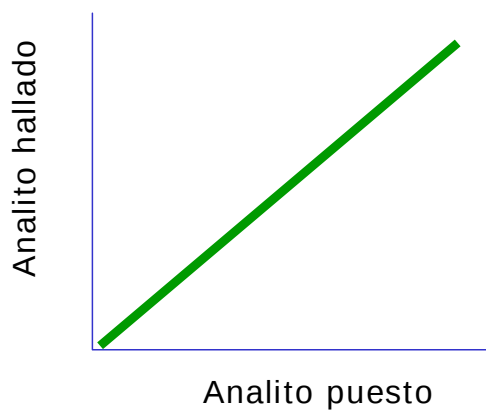
- 1) se comprueba que $s/\sqrt{n}$ (experimental) es menor que s_{cert}
- 2) Nuestro valor $\bar{X}$ debe estar incluido en el intervalo $\bar{X}_0 \pm 2s_{cert}$

Rango de concentraciones amplio y material blanco disponible

Si se dispone de material sin analito, se puede dopar y se calculan los porcentajes de recuperación. Deben tenerse en cuenta problemas químicos adicionales (especiación p.e.)

Se analizan varias réplicas a cada nivel de concentraciones y se compara la media con el valor verdadero. Es mejor actuar sobre 3 niveles de concentraciones: dos extremos y el intermedio.

También se pueden hacer pruebas de regresión. Se representa $x_{hallado}$ frente a x_{puesto} , y la regresión debería ser $x_{hallado} = q + p x_{puesto}$. Debe demostrarse que q y p no difieren de forma significativa de 0 y 1 respectivamente.



Rango de concentraciones amplio y material blanco no disponible

Si no se dispone de material sin analito aún se puede dopar pero los métodos serán diferentes, ahora se analiza una muestra real sin y con μ_0 analito añadido x_{sin} y x_{con} . Hay dos opciones:

Se analizan varias réplicas a cada nivel de concentraciones y se determinan las diferencias $x_{\text{con}} - x_{\text{sin}} = \bar{x}$ que es una estimación de μ_0 . Se hace ahora una prueba t de dos colas ($H_0: \mu = \mu_0$; $H_1: \mu \neq \mu_0$). De esta manera solo se estiman errores sistemáticos proporcionales, ya que los absolutos se compensan.

Otra manera es por el M.A.P. (S.A.M.). Se comparan las pendientes de una línea de calibrado con patrones acuosos y una línea de un M.A.P. Las pendientes deberían ser idénticas. Si difieren hay un error sistemático relativo.

Para encontrar los errores sistemáticos absolutos deben analizarse materiales de referencia o comparar nuestro método con otro.

Comparación de dos métodos o laboratorios

Es la última alternativa, pero ambos métodos deben ser totalmente independientes. Aparece cuando:

- (a) Ninguna de las aproximaciones anteriores vale.
- (b) Cuando se quiere reemplazar un método viejo y validado con uno nuevo más conveniente.
- (c) Cuando se quieren detectar y corregir errores sistemáticos absolutos

Hay dos posibilidades:

- (1) Analizar réplicas (6-8) en un grupo restringido de concentraciones (al menos 3) que cubra todo el intervalo esperado, con los dos métodos. Se utiliza cuando hay un solo tipo de matriz. Se debe hacer pruebas t de muestras independientes, después de hacer una prueba F para ver la igualdad de las varianzas
- (2) Analizar muestras en todo el rango de concentraciones haciendo algunas réplicas (al menos 2). Se emplea cuando hay diversos tipos de matrices y se estudia mediante métodos de regresión, representando x_2 frente a x_1 . La simple inspección visual es de gran ayuda a la hora de detectar comportamientos anómalos. La pendiente debería ser 1 y la ordenada cero. Si $p \neq 1$ hay una discrepancia proporcional entre ambos métodos y si uno está validado el otro sufre de un error sistemático proporcional. Una ordenada en el origen diferente de cero indica una discrepancia absoluta o un error sistemático absoluto si uno de ellos está validado.

Comparación de más de dos métodos o laboratorios

Esta situación no suele darse cuando se hace una validación completa de un método pero suele ocurrir en la exploración preliminar. Se resuelve por medio de ANOVA. Si el rango de concentraciones es restringido y hay un solo tipo de matriz basta con hacer réplicas de un solo material y hacer un ANOVA de una vía (métodos)

Si el rango de concentraciones es amplio o hay varias matrices, debe hacerse un ANOVA de dos vías (materiales y métodos)

5.5 Linealidad de curvas de calibradoCoeficiente de correlación

No es un indicador adecuado. Su valor debe ser además comprobado visualmente

Coeficiente de calidad

$$g = \sqrt{\frac{(\% \text{ desviación})^2}{n - 1}} \quad \text{siendo } \% \text{ desviación} = \frac{(x_{\text{predicho}} - x_{\text{conocido}})}{x_{\text{conocido}}} * 100$$

Cuanto mejor sea el ajuste, más pequeño será el valor de g

Otra posibilidad es la desviación típica relativa de los residuales, que debe ser inferior al 5%.

Prueba F para la falta de ajuste

Deben hacerse medidas replicadas de una línea de calibrado para poder hacer un ANOVA y poder estimar el puro error experimental.

5.6 Límite de detección y cantidades relacionadas

Según la IUPAC es la concentración x_L o cantidad q_L derivada de la medida más pequeña y_L que puede ser detectadas con una certeza razonable con un procedimiento analítico dado.

$$y_L = \bar{y}_{bl} + k s_{bl}$$

$$x_L = k s_{bl} / S$$

donde S es la pendiente de la línea de calibrado (sensibilidad). La IUPAC recomendaba (de acuerdo con Kaiser) que $k = 3$.

En términos generales, el límite de detección es la concentración que origina una señal instrumental significativamente diferente de la del blanco. Hay diferentes versiones, pero todas incluso la de la IUPAC solo protegen contra errores α o de tipo I, pero no contra errores β o de tipo II. Hoy día incluso la IUPAC reconoce 3 versiones:

- Límite de decisión a partir del cual se puede decidir a posteriori si el resultado obtenido indica o no detección
- Límite de detección al cual se puede confiar a priori que el procedimiento analítico permita detectar
- Límite de determinación o cuantificación a partir del cual un procedimiento analítico es capaz de dar un resultado con la suficiente precisión

5.6.1 Límite de decisión (Decisión de detección o valor crítico)

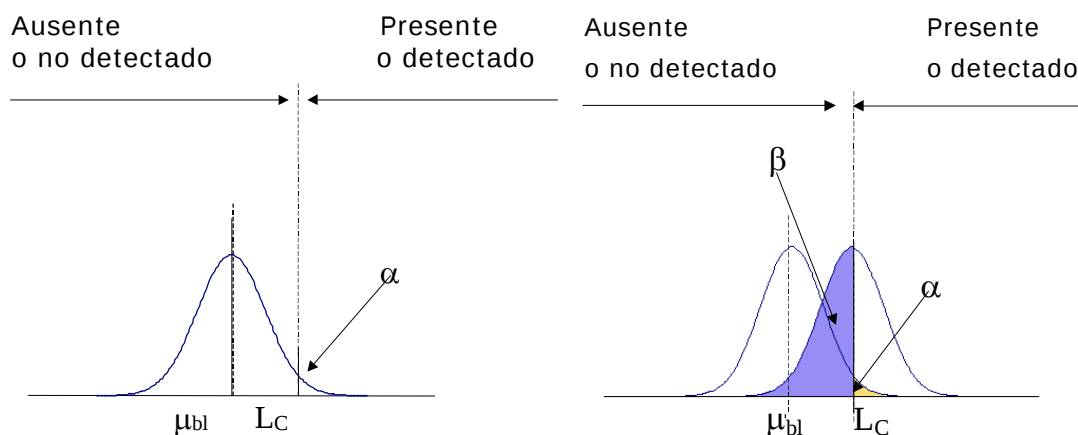
$$L_C = \mu_{bl} + k_C \sigma_{bl}$$

Si $k_C = 3$, coincide con la primitiva versión de la IUPAC.

En esas condiciones solo hay un $\alpha = 0,13\%$ de probabilidades de que una señal mayor o igual que L_C pertenezca al blanco, luego se puede concluir que con una elevada probabilidad ($1-\alpha = 99,87\%$) que el componente ha sido detectado.

En estas condiciones el error β o de tipo II puede llegar a ser del 50%

Este límite ha sido propuesto para tomar una decisión a posteriori, es decir después de que se ha medido la respuesta, sobre la presencia de un componente. Se le puede definir como nivel crítico o límite de decisión por encima del cual una señal puede ser reconocida como detectada. La IUPAC propone un α del 5% lo cual se corresponde con $k_C = 1,645$



5.6.2 Límite de detección (Mínimo valor detectable)

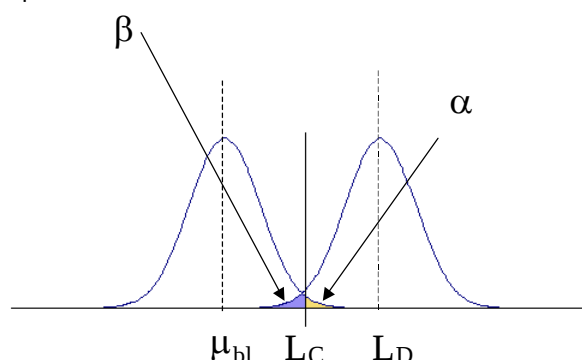
Para reducir el error β no queda más remedio que separar más las distribuciones del blanco y el analito.

$$L_D = L_C + k_D \sigma_{bl} = \mu_{bl} + k'_D \sigma_{bl} \quad \text{siendo } k'_D = k_C + k_D$$

Eso significa lo siguiente: Para una muestra que no contiene analito (su verdadera concentración corresponde a una señal μ_{bl}), menos del $\alpha\%$ de las medidas excederán a L_C . Para una muestra con una concentración verdadera correspondiente a una respuesta L_D , solo el $\beta\%$ de las medidas estarán por debajo de L_C y serán indistinguibles del blanco. Por lo tanto, dado L_C , L_D protege contra falsos negativos.

Si $k_C = k_D = 3$, entonces $\alpha = \beta = 0,13\%$ y además $L_D = \mu_{bl} + 6 \sigma_{bl}$

La IUPAC propone $\alpha = \beta = 5\%$, con lo que en vez de 6 es 3,29 ($2 \cdot 1,645$). Este límite puede ser usado a priori



5.6.3 Límite de cuantificación

Es el nivel al cual la precisión de la medida será satisfactoria para la determinación cuantitativa. Es decir es la concentración que se puede determinar con una desviación típica relativa (DTR) máxima fijada y una adecuada exactitud.

$$L_Q = \mu_{bl} + k_Q \sigma_{bl}$$

Si DTR es del 5%, $k_Q = 20$. La IUPAC propone un valor de 10. En la definición se supone que la σ en el límite de cuantificación es igual que σ_{bl} , pero eso debe comprobarse y suele utilizarse el valor de σ al nivel que se espera para L_Q

5.6.4 Determinación del blanco

Es fundamental el conocer la estimación adecuada de μ_{bl} y σ_{bl} .

Un blanco de reactivos o de disolvente puede dar lugar a resultados demasiado optimistas. Debe emplearse un blanco analítico que contiene todos los reactivos y se analiza de la misma manera que las muestras. El blanco ideal sería un blanco de matriz que duplicaría exactamente la muestra excepto por el analito. Si la determinación se hace con pocas réplicas los valores de k_C , k_D y k_Q deben sustituirse por valores de t con $n-1$ g.d.l.

Otra posibilidad es estimar σ_B a partir de $s_{y/x}$ de una línea de calibrado.

Hay diferentes maneras de hacer la corrección del blanco.

(1) Hasta ahora se ha supuesto que se compara la señal medida con la del blanco. En la práctica, si la corrección del blanco es parte del proceso analítico, la respuesta medida se corrige previamente de la del blanco: con cada muestra (o grupo de muestras) se analiza un blanco, y la respuesta de cada muestra (o de todas las del grupo) es corregida del blanco de forma individual. No obstante la variabilidad del blanco σ_{bl}^2 debe ser conocida de antemano. La decisión se hace comparando la señal neta con cero.

$$y_N = y_{bruta} - y_{bl} \text{ por lo que}$$

$$\sigma_N^2 = \sigma_{bruta}^2 + \sigma_{bl}^2 = 2\sigma_{bl}^2$$

Si la muestra no contiene analito, $y_{bruta} = y_{bl}$, y su diferencia será $N(0, 2\sigma_{bl}^2)$. Por lo tanto los límites de decisión y detección para señales corregidas del blanco serán:

$$L_C = k_C \sigma_0 = k_C \sqrt{2} \sigma_{bl}$$

$$L_D = k'_D \sigma_0 = k'_D \sqrt{2} \sigma_{bl} \quad \text{siendo } k'_D = k_C + k'_D$$

(2) Si la corrección se hace restando la media de n determinaciones del blanco que se llevan a cabo de forma separada, ahora

$$y_N = y_{bruta} - \bar{y}_{bl} \text{ por lo que}$$

$$\sigma_N^2 = \sigma_{bruta}^2 + \sigma_{bl}^2 / n \text{ y si } \sigma \text{ es independiente de la concentración } \sigma_0 = \sqrt{1 + (1/n)} \sigma_{bl}$$

$$L_C = k_C \sigma_0 = k_C \sqrt{1 + (1/n)} \sigma_{bl}$$

$$L_D = k'_D \sigma_0 = k'_D \sqrt{1 + (1/n)} \sigma_{bl} \quad \text{siendo } k'_D = k_C + k'_D$$

5.6.5 Límites de concentración

Los límites en función de la respuesta pueden transformarse en límites de concentración a partir de la pendiente de la línea de calibrado:

$$x_C = k_C \sigma_{bl} / p; \quad x_D = k'_D \sigma_{bl} / p$$

En esas fórmulas se supone que el blanco es bien conocido ya que su variabilidad no se tiene en cuenta. Si este no es el caso, las fórmulas varían ligeramente

$$x_C = \sqrt{1 + (1/n)} k_C \sigma_{bl} / p; \quad x_D = \sqrt{1 + (1/n)} k'_D \sigma_{bl} / p$$

En caso de métodos que implican la medida de picos con líneas base muy ruidosas se ha introducido el concepto de Límite de detección del Método: mínima concentración de sustancia que puede ser identificada, medida y reportada con un 99% de confianza como conteniendo una concentración de analito mayor que cero y se determina del análisis de una muestra en una matriz dada conteniendo el analito. Es confuso pues depende del método, del instrumento y del operador.

Límites de concentración a partir de la línea de calibrado

Ya que la línea de calibrado es solo una estimación de la verdadera línea de regresión, debe tenerse en cuenta su incertidumbre. Para ello se siguen estos pasos:

1) La ecuación que da el intervalo de confianza para la media de m respuestas a un valor particular de $x = x_0$ es:

$$p + q x_0 \pm t_{n-2} s_{y/x} \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{(x_0 - \bar{x})^2}{\sum (x_i - \bar{x})^2}}$$

2) Se calcula y_C que es el límite superior de confianza con una cola para la media de m respuestas cuando la concentración de analito es cero

$$y_C = p + t_{\alpha, n-2} s_{y/x} \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{(\bar{x})^2}{\sum (x_i - \bar{x})^2}}$$

3) Se calcula x_D , lo cual puede hacerse de tres posibles formas

3.1) Como la intersección de la línea $y = y_C$ con la curva describiendo el límite inferior de confianza $y = y_L$ siendo

$$y_L = p + q x_D - t_{\beta, n-2} s_{y/x} \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{(x_D - \bar{x})^2}{\sum (x_i - \bar{x})^2}}$$

que es un método engorroso

3.2) Por iteración. El valor de x_D se define como el valor más pequeño de x que origina un valor para y_L mayor o igual que y_C .

3.3) De forma aproximada (AOAC)

$$x_D = x_C + t_{\beta, n-2} s_{y/x} / p \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{(2x_C - \bar{x})^2}{\sum (x_i - \bar{x})^2}}$$

siendo $x_C = (y_C - p)/q$

4) A partir de x_D puede calcularse también $y_D = p + q x_D$

5.7 Sensibilidad

La IUPAC define la sensibilidad como la pendiente de la línea de calibrado. A veces se emplea erróneamente como sinónimo de límite de detección

La pendiente por sí misma no indica nada, ya que no basta con conocerla para saber si dos concentraciones pueden ser discriminadas entre sí. Se necesita también conocer la desviación típica de esa pendiente.

Se ha propuesto

$$d = (t_{1-\alpha/2} + t_{1-\beta}) s \sqrt{2} (1/p)$$

siendo los valores t para $\alpha=0,05$ (2 colas) y $\beta=0,05$ (1 cola) para el número de g.d.l. con el que se determinó s (desviación típica de la señal)

5.8 Selectividad e interferencias

Cuando otra sustancia, otro conjunto de sustancias o la matriz global tienen efecto sobre la señal del analito y esto no se tiene en cuenta en el método, aparecen errores sistemáticos que afectan al resultado y causan bias. Esto se describe diciendo que hay falta de selectividad o que hay interferencias.

No hay una definición clara y aceptada de estos términos. Interferencia es un término genérico y a menudo se define como sustancia interferente aquella que origina un error sistemático en el resultado analítico.

Los términos selectividad y efecto de matriz pueden diferenciarse en función del tipo de error sistemático que originan. La interferencia de matriz origina errores sistemáticos relativos. Los factores que lo originan pueden ser físicos o químicos y afectan a la pendiente de la línea de calibrado. Se detectan comparando las pendientes de la línea de calibrado y del M.A.P.

Un método es selectivo si ninguna otra especie puede añadir su respuesta a la del analito. La falta de selectividad afecta también al blanco, y si no se corrige originará un error sistemático absoluto. La estadística no ayuda a la hora de detectar problemas de selectividad en los blancos: se necesita razonar químicamente para encontrar los posibles interferentes. Después pueden compararse resultados de series con y sin ellos y ver si ejercen variación sobre la respuesta. En casos extremos puede hacerse un estudio multivariado.

6 MÉTODOS DE VALIDACIÓN EXTERNA

6.1 Tipos de estudios

Se trata de que varios laboratorios analicen el mismo material. Hay tres tipos

- Estudios del método (method-performance) o colaborativos. Se trata de determinar las características y parámetros de calidad de un método específico. Se conocen como estudios de la precisión
- Estudios del laboratorio (laboratory-performance) o estudios de proficiencia, en los que se analiza un material cuya verdadera concentración es conocida o se ha asignado previamente. Se trata de comparar para mejorar los laboratorios
- Estudios de certificación de materiales, en los que se analiza un material por diferentes laboratorios y a menudo con diferentes métodos, para determinar el valor más probable de la concentración de un cierto analito con la menor incertidumbre posible. Se trata de producir materiales de referencia. Es un tipo de estudios reservado a instituciones especiales y no será discutido

6.2. Comparación de métodos (method-performance)

6.2.1 Definiciones

Repetitividad (Repeatability) es la cercanía entre sí de las medidas obtenidas con el mismo método, sobre idéntico material o muestra, en las mismas condiciones (operador, laboratorio, instrumental...) y en un intervalo de tiempo pequeño. Solo puede medirse dentro del laboratorio

Reproducibilidad (Reproducibility) es la cercanía entre sí de las medidas obtenidas por el mismo método sobre idéntico material, en laboratorios diferentes por operadores diferentes utilizando diferente equipo. Solo puede medirse en estudios colaborativos interlaboratorios en los que varios laboratorios analizan el mismo material.

Todas las medidas de la reproducibilidad conducen a modelos de varianza (ANOVA) con un componente intra-laboratorio y uno inter-laboratorio. A partir de ahora todo lo relacionado a repetitividad se representará con r , y lo relacionado con reproducibilidad con R .

El modelo básico es

$$y = \bar{y} + B + e$$

siendo $\bar{y}$ la media general del material analizado, B el componente de laboratorio del bias y e el error aleatorio. Este último se estima mediante s_r^2 o varianza de la repetitividad mientras que B origina s_L^2 , o varianza inter-laboratorio. Por definición el valor medio de B es cero,

$$s_R^2 = s_r^2 + s_L^2$$

De estas ecuaciones se deduce que el componente de laboratorio del bias es un error sistemático para un laboratorio individual pero es aleatorio desde el punto de vista inter-laboratorio

6.2.2 Tipos de experimentos

Lo efectúan p laboratorios que analizan materiales con un método que se está estudiando, a m niveles de concentración, cada uno de los cuales es analizado n veces, siendo 2 el valor recomendado para n .

El número de niveles m depende del rango de concentraciones. ISO recomienda $m \geq 6$ y la IUPAC al menos 5 materiales cuando el material es una combinación de matriz y analito.

El número $p \geq 8$, pero si $n=1$ deberá ser al menos de 15.

El experimento puede ser realizado a un nivel uniforme o dividido (split). A nivel uniforme se hacen $n=2$ réplicas del mismo material. Para evitar prejuicios, se utilizan experimentos de nivel dividido en los que se utiliza un material con concentraciones ligeramente diferentes.

6.2.3 Repetitividad y reproducibilidad

La repetitividad puede describirse con la desviación típica repetitiva (es decir medida en condiciones repetibles), y es una estimación de σ_r . Su valor relativo es DTR_r (RSD_r). Otra forma de medirla es mediante el límite de repetitividad r , que es el valor por debajo del cual se espera con una probabilidad del 95% que esté la diferencia absoluta entre dos medidas individuales obtenidas en condiciones repetibles. La relación entre ambos parámetros es:

$$r = 2,8 \sigma_r$$

De la misma manera se pueden definir la desviación típica reproducible σ_R , el límite de reproducibilidad R y la DTR_R

$$R = 2,8 \sigma_R$$

Estos valores pueden ser incluidos en cláusulas o sentencias del tipo: "La diferencia absoluta entre dos medidas individuales obtenidas en condiciones de reproducibilidad no será mayor de 0,7 mg/l"

6.2.4 Análisis estadístico

Se hacen las siguientes suposiciones

- 1.- La distribución de las medias de un laboratorio a cada nivel es normal
- 2.- Las varianzas entre laboratorios a cada nivel son iguales

Eso implica eliminar 'outliers' (elementos espurios) lo cual se hace por medio de diferentes pruebas (Cochran y Grubbs)

- 3.- A continuación se llevan a cabo ANOVA de una vía a cada nivel. Por último se estudia acerca de si hay relación entre σ_r (s_r) y el nivel de concentraciones.

¿Qué precisión debe esperarse?

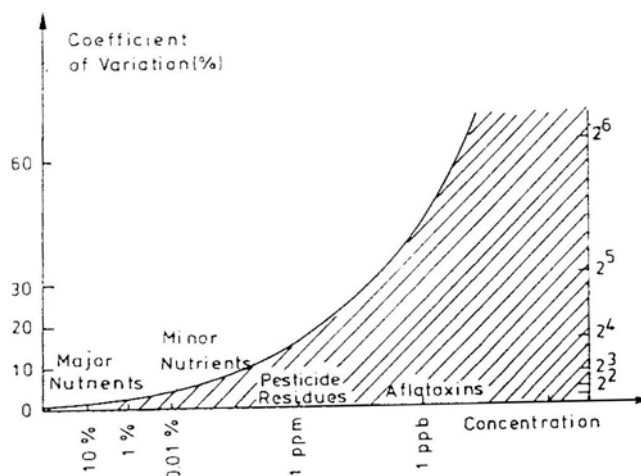
Horwitz y col. Han encontrado al analizar diferentes estudios, la siguiente relación:

$$DTR_R (\%) = 2^{(1-0,5 \log C)}$$

Siendo C la concentración expresada como fracción decimal, p.e $1 \mu\text{g.g}^{-1} = 10^{-6} \text{g.g}^{-1}$. Por tanto, RSD_R se duplica cada vez que la concentración disminuye 100 veces, comenzando en 2% para $C=1$.

Por tanto DTR_R depende solo de la concentración y no del analito ni del método. Se ha propuesto que los valores reportados de DTR_R resultan sospechosos si son dos veces mayores de los de la tabla siguiente

Tipo (C)	C como fracción	DTR_R
Sustancias puras (100 %)	1	2
Fármacos (1 %)	0,01	4
Fármacos en alimentos	0,0001	8
Elementos traza ($\mu\text{g.g}^{-1}$)	0,000001	16
Aflatoxinas (10 ng.g^{-1})	0,00000001	32



6.3 Comparación de laboratorios (laboratory performance)

6.3.1 Métodos visuales

Existen diferentes posibilidades. Supongamos que se dispone de los análisis realizados por 10 laboratorios: una muestra dopada y conteniendo 1,5 ng/ml de analito, y una muestra real muy parecida a la anterior.

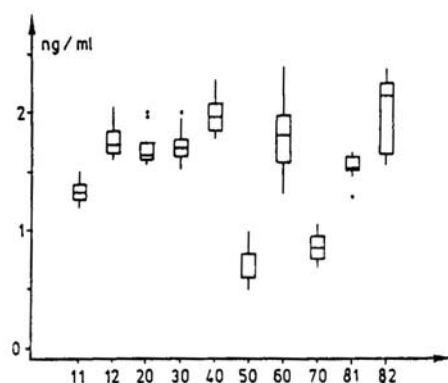
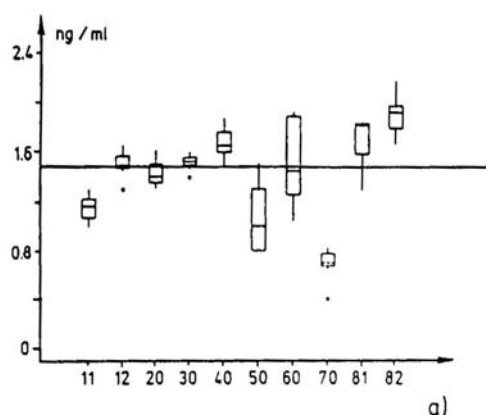
Box plots

Se representan los resultados agrupados en torno a la mediana: la línea media de cada caja es la mediana, la parte inferior y superior muestran el primer y tercer cuartiles (Q_1 y Q_3), y los "bigotes" se extienden hasta la menor y mayor observaciones dentro de las regiones definidas por $Q_1 - 1.5(Q_3 - Q_1)$ y $Q_3 + 1.5(Q_3 - Q_1)$. Los outliers se muestran con asteriscos. La Figura muestra box-plots correspondientes a ambas muestras

Gráficos de Youden

Consisten en representar los resultados de dos muestras con concentraciones similares (pero diferentes) la una frente a la otra para cada laboratorio. El origen se pone en las medianas o las medias de cada muestra. Desde ahí se trazan los ejes que marcan cuatro cuadrantes. Si no hay bias, debe esperarse una agrupación aleatoria. La Figura muestra un gráfico de Youden correspondiente. Habitualmente aparecen laboratorios en los cuadrantes 1º y 3º que implican resultados siempre por exceso o siempre por defecto.

Si todos los laboratorios utilizaran el mismo método, los bias son de laboratorio (laboratory bias)



Box-plots de dos muestras

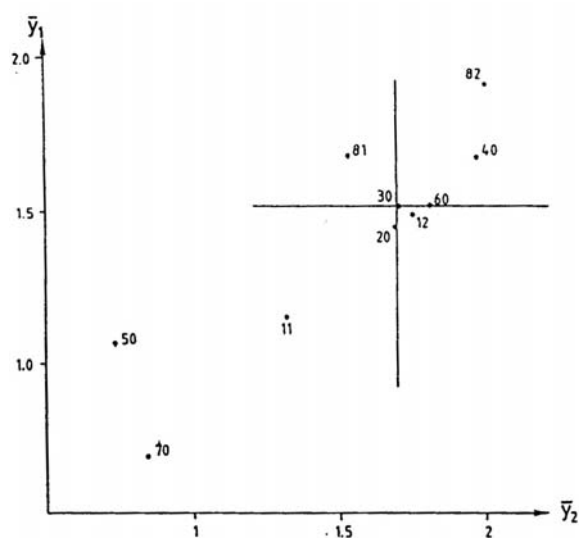


Gráfico de Youden de dos muestras

Estadísticos h y k de Mandel

Sirven para encontrar inconsistencias. h estudia la variabilidad de las medias obtenidas a cada nivel y k compara las desviaciones típicas de los laboratorios.

$$h_{ij} = \frac{\bar{y}_{ij} - \bar{y}_j}{\sqrt{\frac{1}{p_j - 1} \sum_{i=1}^{p_j} (\bar{y}_{ij} - \bar{y}_j)^2}}$$

siendo j el nivel j y los demás símbolos el significado habitual

$$k_{ij} = s_{ij}/S_j \text{ siendo } S_j = \sqrt{\sum_{i=1}^{p_j} s_{ij}^2 / p_j}$$

La ISO da valores indicativos a los niveles del 1 y el 5%. $\bar{y}_{ij} - \bar{y}_j$ es la desviación de la media de la celda $\bar{y}_{ij}$ del laboratorio i al nivel j de la $\bar{y}_j$ que es la media general al nivel j. Por tanto, h compara la desviación de cada laboratorio de la media general a ese nivel, con la desviación típica de las medias obtenidas por los p_j laboratorios que reportaron resultados al nivel j.

Por su parte, k compara la desviación típica s_{ij} del laboratorio i al nivel j con la de todos los laboratorios a ese nivel S_j .

6.3.2 Métodos de rango

Para cada muestra se ordenan los resultados de mayor a menor y al mayor se le da el número 1, al siguiente el 2, etc. Si hay empates se da la media. El score de cada laboratorio es la suma de sus rangos. El score menor será el del laboratorio que sistemáticamente origine los resultados más grandes, y el mayor el del que dé los más pequeños. Resultados extremos son síntoma de bias. Se comparan los scores con los valores críticos y se rechazan los que estén fuera.

6.3.3 Método de z

Sirve para comparar laboratorios entre sí o para comprobar el comportamiento actual de un laboratorio con su comportamiento anterior (una forma de eliminarlos de un grupo de elegidos).

Se calcula como $z = (x - X)/S$

x es el resultado obtenido por el laboratorio, X el valor verdadero o su mejor estimación y S una desviación típica.

Para determinar X o se añade una cantidad conocida de analito a un blanco o se emplea un valor consensuado.

S es el valor obtenido en las pruebas de precisión interlaboratorios, o puede ser un valor meta (target)

Con buenas estimaciones de X y S, z es una variable normalizada, por lo que se espera que $|z| > 2$ en el 4,55% de los casos y que $|z| > 3$ en el 0,27 %. El último nivel indica pobre comportamiento en términos de exactitud y $|z| \leq 2$ es suficiente.

Si se analiza más de un material, se puede hacer un score compuesto (composite), p.e. $SSZ = \sum (z)^2$, que sigue una distribución χ^2 con m g.d.l. siendo m el número de valores de z usados. Se utiliza una tabla: Si $SSZ \leq A$ el resultado es satisfactorio, si $A < SSZ < B$ es cuestionable y si $SSZ \geq B$ es rechazable.

BIBLIOGRAFÍA

Massart D.L., Vandegintse B.G.M., Buydens L.M.C., De Jong S., Lewi P.J. and Smeyers-Verbeke J., *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics*. Elsevier, Amsterdam, 1997