



## POSGRADO INTERINSTITUCIONAL EN CIENCIA Y TECNOLOGIA



### VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS GUIA SUGERIDA DE HERRAMIENTAS ESTADÍSTICAS

# TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:  
MAESTRO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA EN LA ESPECIALIDAD DE METROLOGÍA

PRESENTA

MA. ESTELA GONZÁLEZ CABALLERO

DIRECTORA DE TESIS

DRA. LILIANA VIRGINIA RAQUEL SALDIVAR Y OSORIO

Santiago de Querétaro, Querétaro

25 de agosto del 2015



Director de Posgrado  
PICYT – CIDESI  
Querétaro

Los abajo firmantes, miembros del Comité Tutorial de la alumna Ma. Estela González Caballero, una vez leída y revisada la Tesis titulada **“Validación de métodos analíticos. Guía sugerida de herramientas estadísticas”**, aceptamos que la referida tesis revisada y corregida sea presentada por la alumna para aspirar al grado de **Maestría en Ciencia y Tecnología** en la opción terminal de Metrología durante el Examen de Grado correspondiente.

Y para que así conste firmo la presente a los veinticinco días del mes de agosto del año dos mil quince.

Dra. Liliana Virginia Raquel Saldivar y Osorio  
Tutor Académico



CIENCIA Y TECNOLOGÍA

Director de Posgrado  
PICYT – CIDESI  
Querétaro

Los abajo firmantes, miembros del Jurado del Examen de Grado de la alumna Ma. Estela González Caballero, una vez leída y revisada la Tesis titulada “**Validación de métodos analíticos. Guía sugerida de herramientas estadísticas**”, aceptamos que la referida tesis revisada y corregida sea presentada por la alumna para aspirar al grado de **Maestría en Ciencia y Tecnología** en la opción terminal de Metrología durante el Examen de Grado correspondiente.

Y para que así conste firmamos la presente a los veinticinco días del mes de agosto del año dos mil quince.

Dr. José Julián III Montes Rodríguez  
Presidente

M.C. Martha Gutiérrez Munguía  
Secretario

Dra. Liliana Virginia Raquel Saldivar y Osorio  
Vocal



A Martin, por su paciencia, apoyo y amor  
A Fernanda, Fátima y Martincito por el tiempo que les tome prestado  
A mis padres por cuidarme, en dondequiera que estén.

## AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Liliana por aceptar ser mi asesora, por apoyarme en la realización de este trabajo y por estar al pendiente de mi avance.

A Rocio Arvizu por sus consejos

A mis compañeros de grupo por hacer ligero y agradable el proceso

A Dios por permitirme terminar este proyecto

## INDICE

	<b>Página</b>
<b>Antecedentes</b>	1
<b>Introducción</b>	2
<b>Tema I Parámetros para evaluar el desempeño del método</b>	4
1. Precisión intermedia	5
1.1 Definiciones	5
1.2 Determinación de la precisión intermedia	6
1.3 Evaluación de la precisión intermedia	17
1.4 Ejemplos de aplicación	21
1.5 Conclusiones	29
2. Veracidad	30
2.1 Definiciones	30
2.2 Determinación de la veracidad	33
2.3 Evaluación de la veracidad	36
2.4 Ejemplos de aplicación	48
2.5 Conclusiones	50
<b>Tema II Parámetros de aplicación: alcance del método de prueba</b>	51
1. Intervalo lineal	52
1.1 Definiciones	52
1.2 Determinación del intervalo lineal y/o de trabajo	53
1.3 Evaluación de la linealidad	56
1.4 Ejemplos de aplicación	60
1.5 Conclusiones	65
2. Límite de detección	66
2.1 Definiciones	66
2.2 Determinación del límite de detección	67
2.3 Evaluación del límite de detección obtenido	74
2.4 Ejemplos de aplicación	75
2.5 Conclusiones	79

	<b>Página</b>
3. Límite de cuantificación	80
3.1 Definiciones	80
3.2 Determinación del límite de cuantificación	80
3.3 Evaluación del límite de cuantificación obtenido	83
3.4 Ejemplos de aplicación	83
3.5 Conclusiones	86
<b>Tema III Parámetros para definir las condiciones de medición</b>	<b>87</b>
1. Robustez	88
1.1 Definiciones	88
1.2 Evaluación de la robustez	88
1.3 Ejemplos de aplicación	106
1.4 Conclusiones	113
2. Sensibilidad	114
2.1 Definiciones	114
2.2 Determinación de la sensibilidad	115
2.3 Evaluación de la sensibilidad obtenida	118
2.4 Ejemplos de aplicación	122
2.5 Conclusiones	130
3. Selectividad	131
3.1 Definiciones	131
3.2 Determinación de la selectividad	132
3.3 Evaluación de la selectividad	134
3.4 Ejemplos de aplicación	135
3.5 Conclusiones	136
Anexo I: Constantes estadísticas	138
Índice de fórmulas	143
Índice de fórmulas	146
Índice de fórmulas	146
Referencias	147

## ANTECEDENTES.

La validación de un método analítico (ensayos que involucran mediciones analíticas) o la confirmación de un método normalizado puede considerarse el requisito más importante para asegurar la confiabilidad de los resultados de un método de prueba, como lo establece la norma NMX-EC-17015-IMNC-2006 (ISO/IEC 17025:2005) en su inciso 5.4.5 “Validación de los métodos”.

La evidencia objetiva de la validación es presentada con parámetros que caracterizan el método de prueba de acuerdo a los recursos de cada laboratorio, la norma menciona en el inciso 5.4.5.3: la incertidumbre de los resultados, el límite de detección, la selectividad del método, la linealidad, el límite de repetibilidad o de reproducibilidad, la robustez ante influencias externas o la sensibilidad cruzada frente a las interferencias provenientes de la matriz de la muestra o del objeto de ensayo.

Partiendo del antecedente de las buenas prácticas de laboratorio, tanto la bibliografía especializada como los documentos emitidos por organizaciones internacionales del sector químico coinciden con la norma NMX-EC-17025-IMNC-2006 (ISO/IEC 17025:2005) en los parámetros requeridos para llevar a cabo la validación de un método analítico.

Sin embargo la metodología utilizada para la determinación de estos parámetros se deja a criterio de los usuarios, condicionado a tomar como base bibliografía reconocida. Como consecuencia algunos laboratorios analíticos llegan a utilizar metodologías recomendadas por otros usuarios, tratan de adaptar metodologías de otros campos o adquieren paquetes estadísticos costosos; con lo que la validación de métodos puede convertirse en un proceso largo, costoso y poco amigable.

Este trabajo busca ser una guía que reúna herramientas estadísticas para la determinación de cada uno de los parámetros de validación que suelen ser requeridos; basadas en normas regionales, internacionales y referencias estadísticas generales.



## INTRODUCCIÓN

La validación es definida como “Verificación de que los requisitos especificados son adecuados para un uso previsto” (ASTM E 177, 2013); en una definición más amplia NMX-EC-17025-IMNC-2006 establece “La validación es la confirmación, a través del examen y el aporte de evidencias objetivas, de que se cumplen los requisitos particulares para un uso específico previsto”.

La conferencia internacional de armonización (ICH) declara que las características (requisitos) típicas a ser consideradas son: exactitud, precisión (a través de repetibilidad y precisión intermedia), especificidad, límite de detección, límite de cuantificación, linealidad e intervalo de trabajo (ICH, 1994); ALACC adiciona a las características anteriores robustez. (AOAC, 2007)

Para facilitar la elección de los parámetros que requieren determinarse, de acuerdo al uso y necesidades de aplicación, este trabajo los divide en tres grupos:

**Grupo I: Parámetros para evaluar el desempeño del método:** determinación de la exactitud del método; estos parámetros suelen ser muy utilizados como controles de calidad, por medio de herramientas como: cartas control, diagramas, etc.

- a. Veracidad: a través del Sesgo o recuperación
- b. Precisión intermedia: a través de repetibilidad y reproducibilidad.

**Grupo II: Parámetros para definir el alcance del método:** se busca establecer cuál es el intervalo de medición del laboratorio, a partir de donde y hasta donde puede ser aplicado.

- a. Límite de detección
- b. Límite de determinación (o límite de cuantificación)
- c. Intervalo lineal y de trabajo.

**Grupo III: parámetros para establecer las condiciones de medición:** determinación o comprobación de las condiciones óptimas de aplicación del método de prueba. Estos parámetros suelen estar ya definidos en los métodos normalizados; es por ello que son requeridos en metodologías desarrolladas por los usuarios o en aquellas que son adaptadas a diferente matriz o mensurando.

- a. Robustez
- b. Sensibilidad
- c. Selectividad

Cada uno de los grupos es tratado en un tema; cada uno de estos temas incluye las definiciones emitidas por organizaciones reconocidas y las herramientas estadísticas propuestas para realizar la determinación y evaluación de cada uno de los parámetros.

La validación de métodos descrita en este trabajo está dirigida a estudios intralaboratoriales, esto es, dentro de un solo laboratorio; el propósito puede ser la confirmación de una metodología normalizada utilizando los recursos del laboratorio, la validación de metodologías propias, la verificación del efecto de adecuaciones, calificación de analistas, controles de calidad, etc.

## TEMA I

### PARÁMETROS PARA EVALUAR EL DESEMPEÑO DEL MÉTODO

#### INTRODUCCIÓN AL TEMA.

Los parámetros de precisión (repetibilidad y reproducibilidad) y veracidad (sesgo y/o recuperación), además de ser parte fundamental de la validación y/ o confirmación de un método de prueba analítico, son herramientas estadísticas comúnmente usadas en el control de calidad de los métodos, por medio de los llamados gráficos de control como son, entre otros: dispersión, gráficos  $\bar{x}$ , gráficos r, gráficos  $\bar{x}$ -r.

De hecho, cuando no se cuenta con un valor de referencia para el método, los valores determinados por el laboratorio durante la validación y/ o confirmación pueden servir como valores iniciales de referencia para verificar el desempeño del método, del personal y del laboratorio en general a través del tiempo; además de esto, y como se verá más adelante, en caso de que el laboratorio necesite hacer adecuaciones al método los valores servirán de referencia para pruebas de robustez, selectividad y sensibilidad.

Por ello se clasificaron los parámetros de precisión: repetibilidad y reproducibilidad, y de veracidad: sesgo y recuperación; como parámetros para evaluar el desempeño del método.

La precisión descrita en este tema, es la definida como precisión intermedia, que como está definido más adelante, corresponde a las condiciones de prueba dentro de un solo laboratorio.

## 1. PRECISIÓN INTERMEDIA.

### 1.1 Definiciones.

**1.1.1 Precisión de medición:** cercanía entre indicaciones o valores medidos cuantitativamente obtenidos por mediciones replicadas en el mismo objeto o en objetos similares bajo condiciones específicas.

**Nota 1:** La precisión de medición es usualmente expresada numéricamente por medidas de imprecisión, tales como desviación estándar, varianza o coeficiente de variación bajo condiciones específicas de medición.

**Nota 2:** Las condiciones específicas pueden ser, por ejemplo, condiciones de repetibilidad de las medidas, condiciones de precisión intermedia de medición o condiciones de reproducibilidad de medición.

**Nota 3:** La precisión de las mediciones es utilizada para definir la repetibilidad de la medición, la precisión intermedia de la medición y la reproducibilidad. (VIM, 2012)

**1.1.2 Condiciones de medida de precisión intermedia:** grupo de condiciones que incluyen el mismo procedimiento de medición, mismas instalaciones y réplicas de las mediciones sobre la misma muestra o especímenes similares por un periodo de tiempo largo, puede incluir además otras condiciones que involucren cambios.

**Nota 1:** Los cambios pueden incluir nuevas calibraciones, personal que calibra, operadores y sistemas de medición.

**Nota 2:** La especificación de las condiciones debe incluir aquellas que cambian y las que no lo hacen, en condiciones de rutina. (VIM, 2012)

## 1.2 Determinación de la precisión intermedia:

Por definición, la precisión de un método se expresa numéricamente a través de medidas de imprecisión, más comúnmente definidas como medidas de dispersión. Para describir las metodologías para la determinación de la precisión intermedia se consideraran tres de las medidas de dispersión más utilizadas: desviación estándar, varianza y rango.

Los valores de precisión obtenidos de esta forma serán aplicables a un solo valor (concentración), dado que los laboratorios suelen realizar análisis dentro de un cierto intervalo de mediciones, a menos que se cuente con requerimientos específicos, se sugiere que el laboratorio realice esta determinación en tres concentraciones características: alta, media y baja.

Un análisis estadístico posterior mostrara si la dispersión es válida en todo el intervalo de mediciones definido.

Los estudios para determinar la precisión de un método requieren la medición de varias muestras para obtener un número adecuado de mediciones “n”; aun cuando se sugiere que  $n \geq 15$ . (ISO 5725-3:1994), hay que considerar que la validación de un método debe ser un equilibrio entre costos y confiabilidad de los resultados obtenidos; así que el laboratorio debiera decidir cuál es el número óptimo de mediciones que puede obtener.

Es importante recalcar los siguientes puntos:

- Las mediciones que se realicen deben ser independientes, esto es, no se debe analizar una misma muestra varias veces sino varias muestras para obtener los valores
- Idealmente las muestras a utilizar en un experimento de precisión son los MRC, lo que aseguraría una baja dispersión por la heterogeneidad del material.

### 1.2.1 Determinación de la precisión intermedia por medio de desviaciones estándar.

Se requiere que el laboratorio realice dos grupos de mediciones a muestras similares bajo el método a evaluar con n réplicas en cada grupo:

- a) Uno de los grupos representara la repetibilidad del laboratorio, considerada la menor variabilidad posible, debiera mantenerse mismo analista y mismo equipo en intervalos de tiempo lo más corto posible.
- b) El otro grupo de muestras representara el valor de reproducibilidad; estará integrado por mediciones realizadas buscando la mayor dispersión entre los valores, utilizando la mayor variedad de condiciones posibles en el laboratorio como son: diferente analista, de ser posible diferente equipo y en periodos de tiempo largos. En laboratorios que solo cuentan con un equipo y un analista lo común es realizar el experimento en periodos largos de tiempo, lo que supone diferente calibración y condiciones del equipo en general. Este proceso es el también llamado prueba intralaboratorio.

La desviación estándar de los valores obtenidos se calcula de la siguiente forma:

$$s_{(r \text{ o } R)} = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{k=1}^n (y_k - \bar{y})^2} \quad (1)$$

Dónde:  $s_{(r \text{ o } R)}$  = desviación estándar de la repetibilidad ( $s_r$ ) o de la reproducibilidad ( $s_R$ )

n = número de lecturas

k = enésimo valor

$y_k$  = valor individual

$\bar{y}$  = valor promedio

La desviación estándar obtenida de estos datos representa la repetibilidad o la reproducibilidad para ese punto o concentración.

Si se analiza una cantidad apropiada de mediciones, más de 15 (ISO 5725-3:1994) y si estos se obtienen en un intervalo de tiempo largo, varios meses (ISO 5725-3:1994); el resultado obtenido es más representativo para el método.

- c) Método alternativo. Se obtienen varios grupos de mediciones con  $n$  resultados cada uno; se sugiere que la suma total de los resultados individuales en estos grupos sea de al menos 15 (ISO 5725-3:1994), esto es  $p(n) \geq 15$ , donde  $p$  es el número de grupos y  $n$  el número de lecturas individuales por grupo. La desviación estándar se obtienen con la siguiente ecuación.

$$s_{(r \text{ o } R)} = \sqrt{\frac{1}{p(n-1)} \sum_{j=1}^p \sum_{k=1}^n (y_{jk} - \bar{y}_j)^2} \quad (2)$$

Dónde:  $s_{(r \text{ o } R)}$  = desviación estándar de la repetibilidad o de la reproducibilidad

$p$  = Numero de grupos

$n$  = número de lecturas

$k$  = enésimo valor

$y_{jk}$  = valor individual

$\bar{y}_j$  = valor promedio por grupo

### 1.2.2 Determinación de la precisión intermedia a partir del análisis de varianzas.

Esta herramienta es una de las más referenciadas para la determinación de la precisión de un método de prueba, y aun cuando su aplicación está dirigida a la determinación de la precisión en estudios interlaboratoriales (entre varios laboratorios), es muy recomendable su uso para la determinación de la precisión intermedia de un laboratorio de prueba.

De acuerdo con la metodología descrita en ISO 5725-2:1994 se calcula, separadamente para cada nivel o concentración, la estimación de:

- La varianza de la repetibilidad  $s_r^2$

$$s_{rj}^2 = \frac{\sum_{i=1}^p (n_{ij} - 1) s_{ij}^2}{\sum_{i=1}^p n_{ij} (n_{ij} - 1)} \quad (3)$$

- La varianza interlaboratorios  $s_L^2$

$$s_{Lj}^2 = \frac{s_{dj}^2 - s_{rj}^2}{n_j} \quad (4)$$

Dónde:

$$s_{dj}^2 = \frac{1}{p-1} \sum_{i=1}^p n_{ij} \left[ \bar{y}_{ij} - \bar{y}_j \right]^2 = \frac{1}{p-1} \left[ \sum_{i=1}^p n_{ij} \left( \bar{y}_{ij} \right)^2 - \left( \bar{y}_j \right)^2 \sum_{i=1}^p n_{ij} \right] \quad (5)$$

$$\bar{y}_j = \frac{1}{p-1} \left[ \sum_{i=1}^p n_{ij} - \frac{\sum_{i=1}^p n_{ij}^2}{\sum_{i=j}^p n_{ij}} \right] \quad (6)$$

- Y finalmente, la varianza de la reproducibilidad

$$s_R^2 = s_r^2 + s_L^2 \quad (7)$$

Para el caso particular en que  $n_{ij} = n = 2$  pueden utilizarse fórmulas más sencillas, dando:

$$s_{rj}^2 = \frac{1}{2p} \sum_{i=1}^p (y_{ij1} - y_{ij2})^2 \quad (8)$$

$$s_{Lj}^2 = \frac{1}{p-1} \sum_{i=1}^p \left[ \bar{y}_{ij} - \bar{y}_j \right]^2 - \frac{s_{rj}^2}{2} \quad (9)$$



Para simplificar el proceso, ISO 5725-2:1994 sugiere el análisis estadístico utilizando una hoja de cálculo en Excel como se muestra a continuación:

Tabla de valores:

día, analista	$y_1$	$y_2$	$y_n$	$n_i$	$n_i - 1$	$n_i^2$	$\bar{y}_i$	$\bar{y}_i^2$	$n_i \bar{y}_i$	$n_i \bar{y}_i^2$	$s_i$	$s_i^2$	$(n_i - 1)s_i^2$
1													
2													
p													
Sumatorias				$\sum n_i$		$\sum n_i^2$			$\sum n_i \bar{y}_i$	$\sum n_i (\bar{y}_i)^2$			
				$T_3$		$T_4$			$T_1$	$T_2$			
													$T_5$

Tabla 1

Las diferentes varianzas se calculan de la siguiente forma:

$$s_r^2 = \frac{T_5}{T_3 - p} \quad , \quad (10)$$

$$s_L^2 = \left[ \frac{T_2 T_3 - T_1^2}{T_3(p-1)} - s_r^2 \right] \left[ \frac{T_3(p-1)}{T_3^2 - T_4} \right] \quad , \quad (11)$$

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

Y los valores de precisión:

- Desviación estándar de la repetibilidad:  $s_r = \sqrt{s_r^2}$  (12)

- Desviación estándar de la reproducibilidad:  $s_R = \sqrt{s_R^2}$  (13)

### 1.2.3 Determinación de la precisión intermedia utilizando anova de una vía.

El Anova es una herramienta estadística que suele utilizarse en situaciones en las que interesa analizar una respuesta cuantitativa, llamada habitualmente variable dependiente ( $y_i$ ), medida bajo ciertas condiciones experimentales identificadas por una o más variables independientes ( $x_i$ ).

Bajo este esquema se puede usar Anova como una herramienta para la determinación de los parámetros de precisión, tomando como condiciones experimentales las variables establecidas por el laboratorio en personal, equipo y/o tiempo consideradas en el estudio.

Cuando hay una sola variable que proporciona condiciones experimentales distintas (tratamientos), el análisis recibe los nombres de Anova de un factor, Anova de una vía o One way Anova (Montgomery, 2007).

La determinación de la precisión intermedia mediante Anova no es una metodología poco común, se encuentra referenciada en ASTM E 691-14 y en ISO 5725-3:1994.

#### Descripción de los cálculos Anova:

Se consideran “p” grupos o tratamientos, cada uno con “n” elementos, donde “ $y_{ij}$ ” es la j-ésima medida de la i-ésima muestra. Las medias de los grupos son  $\bar{y}_1, \bar{y}_2, \dots, \bar{y}_k$  y la media de todos los valores agrupados juntos es “ $\bar{y}$ ”.

Al utilizar la herramienta Anova para analizar los datos obtenidos de un experimento en donde se busca determinar la precisión intermedia se adoptara la hipótesis nula de que todas las muestras se extraen de una población con media “ $\mu$ ” y varianza “ $\sigma_0^2$ ”.

Bajo esta hipótesis, “ $\sigma_0^2$ ” se puede estimar de dos formas: una estudia la variación dentro de las muestras y la otra la variación entre muestras (Miller and Miller 2002). Para cada tratamiento “i” hay “n” observaciones  $y_{ij}$

Para fines prácticos, se sugiere colocar los datos obtenidos en un arreglo de la siguiente forma:

Tratamiento	Observaciones (resultados)						Total	Promedio
1	$y_{11}$	$y_{12}$	$y_{13}$	...	...	$y_{1n}$	$Y_1$	$\bar{y}_1$
2	$y_{21}$	$y_{22}$	$y_{23}$	...	...	$y_{2n}$	$Y_2$	$\bar{y}_2$
3	$y_{31}$	$y_{32}$	$y_{33}$	...	...	$y_{3n}$	$Y_3$	$\bar{y}_3$
...	...	...	...	...	...	...	...	...
p	$y_{p1}$	$y_{p2}$	$y_{p3}$	...	...	$y_{pn}$	$Y_p$	$\bar{y}_p$

Tabla 2

La variación en las mediciones se divide en la variación entre los diferentes niveles de la variación o factor (los diferentes tratamientos) y la variación entre individuos dentro de cada nivel. Suponiendo que las medias de los grupos son iguales, la variación entre grupos es comparable a la variación entre individuos.

Las sumas de cuadrados son un paso previo para el cálculo del Anova: el análisis de la variabilidad se basa en la comparación de las sumas de cuadrados medios debidas a la variabilidad entre grupos y la debida a la variabilidad intragrupos (dentro de los grupos).

Las fórmulas para obtener las sumas de cuadrados son las siguientes:

- **Suma de cuadrados entre grupos o tratamientos:** Sumatoria de los cuadrados de la dispersión entre las medias de los grupos y la gran media.

$$SS_{tratamiento} = \sum_{i=1}^k n_i (\hat{y}_i - \bar{y})^2 \tag{14}$$

- **Suma de cuadrados Total:** Sumatoria de los cuadrados de la dispersión entre los valores individuales y la gran media.

$$SC_{total} = \sum_i^k \sum_j^n (y_{ij} - \bar{y})^2 \tag{15}$$

- Suma de cuadrados intra grupos o individuos (error)

$$SS_{error} = SS_{total} - SS_{tratamiento} \tag{16}$$

Construcción de la tabla Anova para el cálculo de la precisión intermedia del laboratorio

Fuente de variación	Grados de libertad	Sumas de Cuadrados	Cuadrados medios o medias cuadráticas	Media cuadrática esperada
analistas, días	<b>p-1</b>	$SS_{tratamiento} = \sum_{i=1}^h n_i (\hat{y}_i - \bar{y})^2$	$CM_{tratamiento} = \frac{SC_{tratamiento}}{p-1}$	
Error	<b>n-1</b>	$SS_{error} = SS_{total} - SS_{tratamiento}$	$CM_{error} = \frac{SC_{error}}{n-1}$	$\sigma_r^2, s_r^2$
Total	<b>N-1</b>	$SC_{total} = \sum_i^h \sum_j^n (y_{ij} - \bar{y})^2$	$CM_{total} = \frac{SC_{total}}{N-1}$	$\sigma_R^2, s_R^2$

Tabla 3 (ISO 5725-3, 1994)

$$N = \sum_i^k n \tag{17}$$

**Consideraciones:**

Para el cálculo de la precisión del método no será necesario el estadístico F, aun cuando forma parte de los datos comunes de las tablas Anova. Sin embargo, es aconsejable verificar que la F calculada sea menor que la F de tablas para el nivel de confianza elegido; ya que será útil al momento de hacer la evaluación de los resultados obtenidos. Una F calculada menor a la F crítica de tablas nos indica que realmente los datos provienen de un mismo grupo de mediciones, esto es, que la media es similar.

El cálculo del cuadrado medio total o medio cuadrática total no suele formar parte de los datos que se obtienen al hacer el cálculo de Anova por paquetes estadístico; se calcula dividiendo la suma de cuadrados total ( $SC_{total}$ ) entre los grados de libertad totales “N-1”.

#### 1.2.4 Determinación de la precisión intermedia mediante el rango.

Gran parte de los métodos de prueba utilizados en los laboratorios de ensayo tienen base métodos ASTM. En ellos es común encontrar como referencia la norma ASTM E 691-14 para el cálculo de los estadísticos de la precisión del método.

La norma ASTM E 691-14 utiliza el rango como medida de dispersión, el uso del rango es muy útil cuando se tiene un número limitado de mediciones debido a que la condición para el uso de esta herramienta es que el número de mediciones  $n \geq 2$ .

La norma NMX-CH-5725-5:1994 también hace referencia al rango como una forma alternativa de determinar la precisión de un método cuando se tienen mediciones duplicadas ( $n=2$ ). Los pasos a seguir de acuerdo a ASTM E 691-14 son:

##### I. Estadísticas de las celdas.

- *Promedio de las celdas*,  $\bar{y}$ : Calcular el promedio por cada factor (analista, día, etc.) usando la siguiente ecuación:

$$\bar{y} = \sum_1^n \frac{y_i}{n} \quad (18)$$

Dónde:

$\bar{y}$  = Promedio de los resultados de prueba en una celda.

$y_i$  = Resultados individuales en una celda, y

$n$  = número de resultados de prueba en una celda.

- *Desviación estándar de las celdas*,  $s$ : Calcular la desviación estándar de los resultados de prueba en cada celda usando la siguiente ecuación:

$$s = \sqrt{\sum (y_i - \bar{y})^2 / (n - 1)} \quad (19)$$

Los símbolos son los mismos que en la ecuación anterior.

## II. Estadísticas intermedias:

- Promedio de los promedios de las celdas,  $\bar{\bar{y}}$ : Calcular el promedio de todos los promedios de las celdas usando la ecuación:

$$\bar{\bar{y}} = \sum_{i=1}^n (\bar{y}) / p \quad (20)$$

Dónde:

$\bar{\bar{y}}$  = El promedio de las celdas promedio para un material.

$\bar{y}$  = Promedios de las celdas individuales, y

$p$  = Días, analistas o condiciones de ensayo (diferentes tiempos, etc.).

- Rango,  $d$ : para cada factor (analista, día, tratamiento), calcular el rango de la celda restando el promedio de los promedios de las celdas de cada uno de los promedios de las celdas, de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$d = \bar{y} - \bar{\bar{y}} \quad (21)$$

- Desviación estándar del promedio de las celdas  $s_{\bar{y}}$ : calcular este estadístico usando la siguiente ecuación:

$$s_{\bar{y}} = \sqrt{\sum_1^p d^2 / (p-1)} \quad (22)$$

- ## III. Estadísticos de precisión:
- las estadísticas de precisión fundamentales son la desviación estándar de la repetibilidad ( $s_r$ ) y la desviación estándar de la reproducibilidad ( $s_R$ ). Otros estadísticos son calculados a partir de estas desviaciones estándar.

- Desviación estándar de la repetibilidad,  $s_r$ : Calcular este estadístico usando la siguiente ecuación:

$$s_r = \sqrt{\sum_1^p s^2 / p} \quad (23)$$

*Dónde:*

- $s_r$  = Desviación estándar de la repetibilidad,
- $s$  = desviación estándar de cada celda, y
- $p$  = Número de tratamientos (analistas, días, etc.).

- *Desviación estándar de la reproducibilidad,  $s_R$* : Calcular un valor provisional de este estadístico usando la siguiente ecuación:

$$(s_R)^* = \sqrt{(s_{\bar{y}})^2 + (s_r)^2 (n-1) / n} \quad (24)$$

*Dónde:*

$s_{\bar{y}}$  y  $s_r$  son obtenidos de las ecuaciones mostradas anteriormente.

El símbolo (\*) indica un valor provisional; el valor obtenido de  $s_R$  debe ser mayor que  $s_r$  para ser considerado como el valor final de  $s_R$ .

#### IV. Repetibilidad y Reproducibilidad.

Finalmente se calculan los límites de repetibilidad y reproducibilidad con un nivel de confianza del 95% de acuerdo a las siguientes ecuaciones:

$$r = 2.8 \times S_r \quad (25)$$

$$R = 2.8 \times S_R \quad (26)$$

### 1.3 Evaluación de la precisión intermedia

Una vez hecha la determinación de los parámetros de precisión la pregunta es ¿los valores obtenidos son adecuados (aceptables) o no? Las técnicas que pueden apoyar al laboratorio a obtener una conclusión sobre sus resultados dependen de la información con que cuente el laboratorio:

**1.3.1 Métodos normalizados con precisión conocida:** el laboratorio cuenta con valores de precisión de referencia para el método; se consideran tres casos:

- a. No se tiene información sobre el número de datos “n” que se utilizaron para la determinación de la precisión de referencia reportada para el método normalizado; en este caso se utiliza el estadístico  $\chi_p^2(\nu)$

El criterio de aceptación es:

$$\frac{s_R^2 B}{\sigma_r^2 A} \leq \frac{\chi_{(1-\alpha)}^2(\nu_{RB})}{\nu_{RB}} \quad (27)$$

Dónde:

$s_R^2 B$  = Varianza de la reproducibilidad obtenida por el laboratorio

$\sigma_r^2 A$  = Varianza de la repetibilidad o reproducibilidad del método normalizado

$\nu_{RB}$  = Grados de libertad utilizados por el laboratorio (n-1).

- A menos que se indique de otra forma, el nivel de significación  $\alpha$  se asume igual a 0.05.
- Como se indica en la formula, la relación entre las varianzas debe ser menor que  $\chi_p^2(\nu)$  para el grado de significación establecido y n valores utilizados (ISO-5725-6-1994).



**b. Intervalos de confianza para los parámetros de precisión usando ji-cuadrada**

$$L_i < \sigma^2 < L_s \ ; \ L_i = \frac{(n-1)s^2}{\chi^2_{\alpha}} \quad \text{y} \quad L_s = \frac{(n-1)s^2}{\chi^2_{\alpha-1}} \quad (28, 29)$$

Dónde:

$L_i$ = Valor del Límite inferior para el parámetro de precisión

$L_s$ = Valor del Límite superior para el parámetro de precisión

$\sigma^2$  = Varianza del método normalizado (repetibilidad o reproducibilidad)

$s^2$  = Varianza del obtenida por el laboratorio.

$n$  = Numero de mediciones totales realizadas por el laboratorio.

Al igual que en el caso anterior el nivel de significación  $\alpha$  se asume igual a 0.05 a menos que se especifique o requiera otra cosa.

**Criterio de aceptación:** Como lo indica el intervalo, el valor obtenido por el laboratorio debe encontrarse dentro de los límites inferior y superior calculados.

- c.** Se tiene información sobre el número de mediciones “n” utilizadas para la determinación de la precisión reportada del método normalizado; en este caso se usa el estadístico F.

El criterio de aceptación es:

$$F_r = \frac{s_{RB}^2}{s_A^2} \leq F_{tablas}; \quad (30)$$

- Sí  $F_{\alpha/2}(v_{RB}, v_{rA}) \leq F_r$ ; No hay evidencia de que la precisión del método de prueba sea diferente a la establecida en el método normalizado.
- Sí  $F_r \leq F_{1-\alpha/2}(v_{RB}, v_{rA})$ ; La precisión obtenida se considera diferente a la establecida en el método de prueba.

### 1.3.2 Métodos normalizados de precisión no conocida.

¿Cómo evaluar la precisión de un método si no se cuenta con un valor de referencia para la repetibilidad o la reproducibilidad?

Se sugieren las herramientas que se mencionan a continuación:

- a) **Por medio de estudios interlaboratoriales:** comparación de la repetibilidad determinada en el ensayo con la reproducibilidad del laboratorio; utilizando el estadístico F descrito antes arriba.
- b) **Relacionando la precisión obtenida con el valor medio (media o promedio) del mensurando.** una de las relaciones más reconocidas es la de Horrat. A continuación se describe el esta metodología.

**Relación de Horrat o Valor Horrat:** se obtiene a partir de la relación entre la desviación estándar relativa de la reproducibilidad ( $RSD_R$ ) calculada de los datos y la desviación estándar relativa predicha  $PRSD_{(R)}$  calculada a partir de la ecuación de Horwitz (AOAC, 2008):

$$HORRAT = RSD_{(R)} / PRSD_{(R)} \quad (31)$$

Dónde:

- $RSD$ : desviación estándar relativa, también conocida como coeficiente de variación, se obtiene al dividir la desviación estándar obtenida de los datos obtenidos entre la media (promedio) de los datos. Las unidades de ambos parámetros deben ser las mismas.
- $PRSD_{(R)}$  o  $PRSD_R$  : La desviación estándar relativa predicha de la reproducibilidad es calculada a través de la ecuación de Horwitz:

$$PRSD_{(R)} = 2C^{-0.15} \quad (32)$$

C está expresado como fracción en masa, donde las unidades del numerador y denominador serán las mismas; por ejemplo para un metal puro, esto es con una concentración de 100%, la fracción en masa es  $C = 1.00$ ; para una concentración de  $1 \mu\text{g/g}$  (ppm),  $C = 0.000001 = (E-6) = 1 \times 10^{-6}$ .

Para diferenciar el valor Horrat calculado para la reproducibilidad se añade una R a la formula; para el valor Horrat de la repetibilidad se añade una r; en los denominadores siempre se usa el valor calculado de la reproducibilidad PRSD<sub>R</sub>, porque este parámetro suele presentar menos variación que el valor calculado de la repetibilidad.

$$\text{HORRAT} = \text{RSD}_{(R)} / \text{PRSD}_{(R)}$$

$$\text{HORRAT}_{(R)} = \text{RSD}_R / \text{PRSD}_{(R)}$$

$$\text{HORRAT}_{(r)} = \text{RSD}_r / \text{PRSD}_{(R)}$$

**Criterio de aceptación:** Los valores aceptables de HORRAT(r) están entre 0.3 – 1.3 (AOAC, 2004). Los valores en los extremos de este intervalo debieran ser analizados por el laboratorio:

- Cuando se obtienen valores bajos se sugiere verificar valores de concentración no reportados o no utilizados dentro del promedio o verificar resultados históricos para el mismo MR.
- Los valores altos pueden deberse a deficiencias del método tales como restricciones de tiempos, temperatura, masa, volúmenes y concentraciones; impurezas no reconocidas (residuos de detergente en el material volumétrico, residuos de solventes en extracciones), extracciones y transferencias incompletas; y parámetros no controlados en técnicas instrumentales específicas.

#### **Limitaciones de uso de la relación de Horrat:**

El valor HORRAT es un estimado de la precisión muy general pero útil en química analítica. Sin embargo, la predicción suele mostrar más variabilidad en el extremo superior de la escala: para concentraciones  $C > 0.1$ ; por ejemplo  $C > 10\%$ , y en el extremo más bajo de la escala:  $C < 1 \times 10^{-8}$  (E-8); por ejemplo., 10 ng/g; 10 ppb.

### 1.4 Ejemplos de aplicación.

Para ejemplo del uso de las herramientas estadísticas descritas se usó uno de los grupos de valores presentado en el anexo A ejemplo 1 (tabla A.1) de la norma ISO 5725-2:1994

Grupo p	y <sub>1</sub>	y <sub>2</sub>	y <sub>3</sub>	y <sub>4</sub>	y <sub>5</sub>
1	0.71	0.71	0.70	0.71	
2	0.69	0.67	0.68		
3	0.66	0.65	0.69		
4	0.67	0.65	0.66		
5	0.70	0.69	0.66	0.71	0.69
6	0.73	0.74	0.73		
7	0.71	0.71	0.69		
8	0.70	0.65	0.68		

#### 1.4.1 Determinación por medio de desviaciones estándar

a) Considerando los valores presentados como un solo grupo. Los cálculos obtenidos son:

Número total de mediciones:  $n = 27$

Promedio:  $\bar{y} = 0.69$

Desviación estándar:

$$s_{roR} = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{k=1}^n (y_k - \bar{y})^2}$$

$$s = 0.0255$$

b) Tomando por separado los "p" grupos de mediciones, los cálculos realizados son:

Grupo p	y <sub>1</sub>	y <sub>2</sub>	y <sub>3</sub>	y <sub>4</sub>	y <sub>5</sub>	$\bar{y}_j$
1	0.71	0.71	0.70	0.71		0.71
2	0.69	0.67	0.68			0.68
3	0.66	0.65	0.69			0.67
4	0.67	0.65	0.66			0.66
5	0.70	0.69	0.66	0.71	0.69	0.69
6	0.73	0.74	0.73			0.73
7	0.71	0.71	0.69			0.70
8	0.70	0.65	0.68			0.68

Grupo p	$(y_{jk} - \bar{y}_j)^2$				
1	0.000385	0.00038	$9.273 \times 10^{-5}$	0.000385	
2	$1.372 \times 10^{-7}$	0.000415	0.000107		
3	0.000922	0.001629	$1.372 \times 10^{-7}$		
4	0.000415	0.001629	0.000922		
5	$9.273 \times 10^{-5}$	$1.372 \times 10^{-7}$	0.000922	0.000385	$1.372 \times 10^{-7}$
6	0.00157	0.00246	0.00157		
7	0.000385	0.000385	$1.372 \times 10^{-7}$		
8	$9.273 \times 10^{-5}$	0.00162	0.000107		
$\Sigma (y_{jk} - \bar{y}_j)^2$	0.000386	0.008538	0.003723	0.00077	$1.372 \times 10^{-7}$

Desviación estándar:

$$s_{r o R} = \sqrt{\frac{1}{p(n-1)} \sum_{j=1}^p \sum_{k=1}^n (y_{jk} - \bar{y}_j)^2}$$

$$s = 0.02549$$

### 1.4.2 Determinación empleando análisis de varianzas

Tomando los mismos valores del ejemplo de desviación estándar y utilizando la hoja de Excel propuesta por ISO 5725-2:

Grupo p	y <sub>1</sub>	y <sub>2</sub>	y <sub>3</sub>	y <sub>4</sub>	y <sub>5</sub>	n <sub>j</sub>	n <sub>j</sub> <sup>2</sup>	ȳ <sub>j</sub>	s <sub>j</sub>
1	0.71	0.71	0.70	0.71		4	16	0.71	0.005
2	0.69	0.67	0.68			3	9	0.68	0.01
3	0.66	0.65	0.69			3	9	0.67	0.021
4	0.67	0.65	0.66			3	9	0.66	0.01
5	0.70	0.69	0.66	0.71	0.69	5	25	0.69	0.019
6	0.73	0.74	0.73			3	9	0.73	0.0058
7	0.71	0.71	0.69			3	9	0.70	0.011
8	0.70	0.65	0.68			3	9	0.68	0.025
						Σn <sub>j</sub>	Σn <sub>j</sub> <sup>2</sup>	Gran media	
						27	95	0.6896	

T<sub>3</sub>

T<sub>4</sub>

Grupo p	n <sub>j</sub> ȳ <sub>j</sub>	n <sub>j</sub> <sup>-2</sup> y <sub>j</sub> <sup>2</sup>	s <sub>j</sub> <sup>2</sup>	(n <sub>j</sub> -1)s <sub>j</sub> <sup>2</sup>
1	2.83	2.00	0.000025	7.5 x 10 <sup>-5</sup>
2	2.04	1.39	1 x 10 <sup>-4</sup>	0.0002
3	2.00	1.33	0.000433	0.000867
4	1.98	1.31	0.0001	0.0002
5	3.45	2.38	0.00035	0.0014
6	2.20	1.61	3.33 x 10 <sup>-5</sup>	6.66 x 10 <sup>-5</sup>
7	2.11	1.48	0.00013	0.000267
8	2.03	1.37	0.00063	0.001267
Σ n <sub>j</sub> ȳ <sub>j</sub>		Σ n <sub>j</sub> <sup>-2</sup> y <sub>j</sub> <sup>2</sup>	Σ s <sub>j</sub> <sup>2</sup>	Σ (n <sub>j</sub> -1)s <sub>j</sub> <sup>2</sup>
18.64		12.881	0.0018	0.00434

T<sub>1</sub>

T<sub>2</sub>

T<sub>5</sub>

$$s_r^2 = \frac{T_5}{T_3 - p}$$

$$s_r^2 = \frac{0.00434}{27 - 8}$$

$$s_r^2 = 0.0002285$$

$$s_r = 0.01512$$

$$s_L^2 = \left[ \frac{T_2 T_3 - T_1^2}{T_3(p-1)} - s_r^2 \right] \left[ \frac{T_3(p-1)}{T_3^2 - T_4} \right] = \left[ \frac{(12.881)(27) - (18.64)^2}{27(8-1)} - 0.0002285 \right] \left[ \frac{27(8-1)}{(27)^2 - 95} \right]$$

$$s_L^2 = 0.0004665$$

$$s_R^2 = s_r^2 + s_L^2 = 0.0002285 + 0.0004665 = 0.00073; \quad s_R = 0.026$$

**1.4.3** Determinación utilizando la técnica estadística del análisis de varianza (Anova)

Cálculo realizado con las herramientas de análisis de datos de Excel (Anova para un solo factor o de una vía) para los mismos datos de las técnicas anteriores.

Presentación de los resultados en Excel:

RESUMEN				
<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
1	4	2.83	0.7075	0.000025
2	3	2.04	0.68	1E-04
3	3	2	0.66666667	0.00043333
4	3	1.98	0.66	0.0001
5	5	3.45	0.69	0.00035
6	3	2.2	0.73333333	3.3333E-05
7	3	2.11	0.70333333	0.00013333
8	3	2.03	0.67666667	0.00063333

ANOVA						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	0.01255463	7	0.00179352	7.84879505	0.000162758	2.5435343
Dentro de los grupos	0.00434167	19	0.00022851			
Total	0.0168963	26				

- Promedio de los cuadrados dentro de los grupos =  $CM_{\text{error}} = s_r^2 = 0.00022$   
 $s_r = 0.01511$

- La suma de cuadrados total se divide entre los grados de libertad totales para obtener el promedio de los cuadrados totales que equivale a la varianza de la reproducibilidad:

$$CM = \text{Suma de cuadrados total} / \text{grados de libertad}$$

$$CM = s_R^2 = 0.01689 / 26 = 0.0006498$$

$$s_R = 0.002549$$

#### 1.4.4 Determinación de precisión intermedia mediante el rango.

Utilizando los mismos datos del anexo A ejemplo 1 (tabla A.1) de la norma ISO 5725-2:1994, se utiliza la metodología descrita en ASTM E 691-14

Grupo $p$	$y_1$	$y_2$	$y_3$	$y_4$	$y_5$	$n_j$	$\bar{y}_j$	$s_j$	Rango $d$	$d^2$
1	0.71	0.71	0.70	0.71		4	0.71	0.005	0.02	0.000317
2	0.69	0.67	0.68			3	0.68	0.01	-0.01	$9.38 \times 10^{-5}$
3	0.66	0.65	0.69			3	0.67	0.021	-0.02	0.00053
4	0.67	0.65	0.66			3	0.66	0.01	-0.03	0.00088
5	0.70	0.69	0.66	0.71	0.69	5	0.69	0.019	0.00	$9.77 \times 10^{-8}$
6	0.73	0.74	0.73			3	0.73	0.0058	0.04	0.0019
7	0.71	0.71	0.69			3	0.70	0.011	0.01	0.00018
8	0.70	0.65	0.68			3	0.68	0.025	-0.01	0.00017

Número de laboratorios ( $p$ ): 8

Número de datos en cada laboratorio ( $n$ ): 3 a 5

Promedio de todas las celdas ( $\bar{y}$ ): 0.69

Desviación estándar del promedio de las celdas ( $s_{\bar{y}}$ ) = 0.024152038

$$\sum_1^p \frac{s^2}{p} = 0.000583321$$

$$s_r = \sqrt{\sum_1^p \frac{s^2}{p}} = 0.015034682$$

$$s_y^2 = 0.000583321$$

$$s_r^2 = 0.000226042$$

$$(s_r)^2 \frac{(n-1)}{n} = 0.000150694$$

$$(s_{\bar{y}})^2 + (s_r)^2 \frac{(n-1)}{n} = 0.000734015$$

$$(s_R)^* = \sqrt{(s_{\bar{y}})^2 + (s_r)^2 \frac{(n-1)}{n}} = 0.027092718$$



### 1.4.5 Comparación de metodologías:

Las metodologías descritas anteriormente para determinar la precisión intermedia de un laboratorio aparentan ser un poco distintas entre sí; y de hecho los resultados obtenidos son ligeramente diferentes, así que la cuestión es si un laboratorio puede hacer uso indistinto de ellas sin verse afectado por esta pequeña diferencia.

Se muestran los resultados obtenidos con el mismo grupo de mediciones por las diferentes metodologías en la siguiente tabla:

**Tabla resumen:**

Metodología	Repetibilidad	Reproducibilidad
Desviación estándar	--	0.025
Varianza	0.015	0.026
Anova	0.015	0.025
Rango	0.015	0.027

Cuando se realiza un estudio de precisión intermedia, el laboratorio toma una serie de valores obtenidos bajo diferentes condiciones y espera que los resultados representen el comportamiento ordinario del laboratorio.

Bajo esta consideración, los resultados pueden diferir si se realiza otro estudio posterior aunque se busque igualar las condiciones de la prueba; los resultados variaran dentro de un intervalo de valores determinado por el nivel de confianza que el laboratorio elija.

$$L_i < \sigma^2 < L_s$$

Para determinar este intervalo de valores se requiere calcular los límites inferior y superior para los parámetros de repetibilidad y reproducibilidad. La secuencia se presenta a continuación:

- El intervalo de confianza, los límites inferior y superior de la dispersión permitida, será calculado con la función ji cuadrada

$$L_i = \frac{(n-1)s^2}{\chi_\alpha^2} \quad \text{y} \quad L_s = \frac{(n-1)s^2}{\chi_{\alpha-1}^2}$$

Dónde:

$L_i$  = Límite inferior del intervalo

$L_s$  = Límite superior

$s^2$  = Varianza de referencia

$\chi_\alpha^2, \chi_{\alpha-1}^2$  = ji cuadrada para un nivel de confianza  $\alpha$  y  $\alpha-1$

- Como se requieren valores de referencia de la varianza, se toman los resultados que se obtuvieron con el método descrito en la norma ISO 5725-2,  $r=0.01524$  y  $R=0.02632$ , por ser iguales a los datos mostrados en la norma.

- En este caso, para un 95 % de nivel de confianza:  $\alpha = 0.05$

$$\chi_\alpha = 38.8851$$

$$\chi_{\alpha-1} = 15.3792$$

- Sustituyendo en las fórmulas para la varianza de la repetibilidad:

$$L_i = \frac{(n-1)s^2}{\chi_\alpha^2} = \frac{(27-1)(0.01524)^2}{38.8851} = 0.0001528$$

$$L_s = \frac{(n-1)s^2}{\chi_{\alpha-1}^2} = \frac{(27-1)(0.01524)^2}{15.3792} = 0.0003863$$

Una vez obtenida la raíz cuadrada de los límites el intervalo de confianza para los valores de repetibilidad calculado es:

$$L_i = 0.012360798$$

$$L_s = 0.019654918$$

- Sustituyendo en las fórmulas para la reproducibilidad:

$$L_i = \frac{(n-1)s^2}{\chi^2_\alpha} = \frac{(27-1)(0.02632)^2}{38.8851} = 0.0004647$$

$$L_s = \frac{(n-1)s^2}{\chi^2_{\alpha-1}} = \frac{(27-1)(0.02632)^2}{15.3792} = 0.001175 ;$$

Una vez obtenida la raíz cuadrada de los límites el intervalo de confianza para los valores de reproducibilidad calculado es:

$$L_i = 0.021557726$$

$$L_s = 0.034278963$$

#### 1.4.5.1 Ejemplo de uso con número un número reducido de mediciones.

Es común que en los laboratorios sea posible realizar muchas muestras para este tipo de estudios, ya sea por los costos de la realización de cada uno de las mediciones, porque los tiempos son largos o porque no se cuenta con suficiente material para hacer varias mediciones, incluso puede ser una combinación de varios de los motivos mencionados.

En este caso suele reducirse el número de mediciones para el experimento, ahora la pregunta es ¿afecta el resultado de la determinación de los parámetros?

Veamos un ejemplo con parte de los datos anteriores.

Comparativo de las metodologías de repetibilidad y reproducibilidad en estudio de 3 x 3

Analista	y1	y2	y3
1	0.71	0.71	0.70
2	0.69	0.67	0.68
3	0.66	0.65	0.69

Metodología	Repetibilidad	Reproducibilidad
Desviación estándar	--	0.021
Varianza	0.014	0.023
Anova	0.012	0.024
Rango	0.014	0.023

Intervalo de aceptación de los valores de precisión:

- repetibilidad:

$$Li = 0.012360798$$

$$Ls = 0.019654918$$

- Reproducibilidad:

$$Li = 0.021557726$$

$$Ls = 0.034278963$$

### 1.5 Conclusiones:

Se observa que todos los valores calculados por las diferentes metodologías están dentro del intervalo calculado; por lo tanto, es posible utilizar cualquiera de estas herramientas para el cálculo de los valores de precisión y tendremos valores dentro de lo que se esperaría utilizando la metodología más reconocida

Los valores obtenidos utilizando menos mediciones continúan dentro del intervalo determinado para todos los datos; en conclusión lo más importante es que los datos sean obtenidos en condiciones estables, con el método totalmente implementado, con el equipo y el personal adecuado.

## 2.0 VERACIDAD

### 2.1 Definiciones

**2.1.1 Veracidad:** grado de concordancia existente entre el valor promedio obtenido de una gran serie de resultados y el valor de referencia aceptado (ISO 3534-1: 2006).

**2.1.2 Sesgo:** Diferencia entre el valor esperado de los resultados y un valor de referencia aceptado (ISO 3534-1: 2006).

**2.1.3 Recuperación:** proporción de la cantidad de un analito, presente o adicionada a una porción analítica de un material de prueba, la cual es extraída y presentada para medición (IUPAC, 1999b).

Actualmente el término “recuperación” es utilizado en dos contextos diferentes (IUPAC 1999a):

- Para expresar el rendimiento o desempeño de un analito en un estado de pre concentración o extracción en un método analítico (desempeño del proceso).
- Para designar la proporción de la concentración encontrada,  $c$ , obtenida a partir de un proceso analítico usando una gráfica de calibración para comparar con un valor de referencia,  $c_{ref}$ , por ejemplo:  $R = c / c_{ref}$ .

**2.1.4 Valor de referencia aceptado:** Valor que sirve como referencia consensuada para la comparación, a partir de:

- a) Un valor teórico o establecido, con base en principios científicos;
- b) Un valor asignado o certificado, con base en trabajos experimentales de alguna organización nacional o internacional;

- c) Un valor certificado o consensado, con base en trabajos de colaboración experimental bajo los auspicios de algún grupo científico o técnico.
- d) Cuando no se dispone de a), b) o c), el valor supuesto de la magnitud (medible); por ejemplo, la media de una población especificada de mediciones (ISO 3534-1:2006) (ISO-5725-1-1994)

### 2.1.5 Material de referencia:

La veracidad puede ser evaluada a través del análisis de materiales de concentración conocida, esto es, materiales de referencia. No todos los materiales de referencia tienen el mismo nivel de trazabilidad.

De acuerdo a su nivel de trazabilidad, en orden descendente, las referencias más comúnmente usadas en análisis químicos son las siguientes:

- a. **Materiales de referencia certificados (MRC);** material de referencia, acompañado por documentación emitida un organismo autorizado y que provee los valores de una o más propiedades específicas junto con sus incertidumbres asociadas y trazabilidad usando procedimientos (VIM, 2012). Los MRC deben ser usados siempre que sea posible pues proveen el más alto nivel de trazabilidad. Pueden ser utilizados, siempre y cuando sean lo más similar posible a las muestras de rutina utilizadas en términos de matriz y concentración de los analitos.
- b. **Materiales de referencia (MR) o materiales internos:** Material suficientemente homogéneo y estable con referencia a propiedades específicas, las cuales han sido establecidas para hacer cumplir con su uso intencionado en mediciones o en el examen de propiedades nominales. (VIM, 2012). No siempre es posible usar MRC debido a la limitada disponibilidad de materiales semejantes a las muestras de rutina; los materiales de referencia o materiales internos pueden ser utilizados en el intervalo del contenido establecido para el analito. Preferiblemente el analito debe ser determinado usando dos diferentes métodos base o dos diferentes principios físicos, y de ser posible, basados en determinaciones llevadas a cabo en diferentes laboratorios (IUPAC 1999a) (Boque et al., 2002).

- c. Métodos de referencia:** La veracidad puede ser determinada utilizando un método de referencia siempre y cuando éste sea bien conocido y dominado por el laboratorio. La misma muestra representativa es analizada con el método de referencia y el método a ser evaluado, de manera que se determine la veracidad de dicho método de prueba. Las muestras deben de ser lo más homogéneas posibles, estables y lo más similar posible a las muestras de rutina en matriz y concentración de los analitos.
- d. Ensayos de aptitud:** La veracidad puede ser determinada cuando un laboratorio participa en un ensayo de aptitud. En este caso, el valor de referencia corresponde al valor obtenido por consenso entre los laboratorios participantes (Boque et al., 2002).
- e. Muestras adicionadas:** Aunque estas referencias presentan el nivel de trazabilidad más bajo, pueden ser utilizadas cuando no se encuentran disponibles otras opciones. Estas tienen la desventaja que el sesgo puede ser estimado de forma incorrecta si el analito adicionado tiene un diferente comportamiento que el analito en su estado natural (libre). Por otro lado, una muestra adicionada puede ser una buena representación del analito libre en el caso de muestras líquidas y en métodos analíticos que involucran la total disolución o destrucción de las muestras (IUPAC, 1999b). El comportamiento del analito puede ser investigado usando al menos un material de referencia.

La referencia seleccionada debe ser aquella con un nivel adecuado de trazabilidad para el propósito de la medición

## 2.2 Determinación de la veracidad.

La muestra de referencia seleccionada debe ser analizada “n” veces con el método a ser validado en diferentes corridas; por ejemplo: diferentes días, diferentes operadores, etc. El número de mediciones que se utilizarán para determinar la veracidad es arbitraria, la regla general es “a más ensayos independientes la precisión es mejor”.

La mejora, según se mide por la anchura del intervalo de confianza para la media, sigue la raíz cuadrada del número de ensayos. Una vez que los valores utilizados están por arriba de 8-10 réplicas, la mejora se incrementa muy poco, por ello es recomendable analizar al menos 10 réplicas (AOAC, 2002).

Se calcula un valor promedio y la desviación estándar de los “n” valores obtenidos con las siguientes fórmulas:

a) El promedio,  $\bar{y}$ , de los n resultados de la prueba,  $y_i$  :

$$\bar{y} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n y_i \quad (33)$$

b)  $S_y$  estimado de la desviación estándar  $\sigma_x$  de los datos del laboratorio:

$$s_y = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}$$

**2.2.1 Determinación de la veracidad a través del sesgo:** Cuando se utiliza un material de referencia certificado (MRC), un material de referencia interno (MR), un valor proveniente de un método alternativo reconocido o un valor resultado de un ensayo de aptitud (interlaboratorial), es más adecuado determinar la veracidad mediante el uso del sesgo. El cálculo del sesgo para un método de medición está dado por:

$$\hat{\delta} = \bar{y} - \mu ; \quad (34)$$



Dónde:

$\hat{\delta}$  = Sesgo del método; puede ser positivo o negativo o reportarse como valor absoluto

$\bar{y}$  = Media del método de prueba (obtenida, por ejemplo, mediante un estudio interlaboratorial)

$\mu$  = valor de referencia

Mientras que la estimación del sesgo de laboratorio está dada por:

$$\hat{\Delta} = \bar{y}_w - \mu \quad (35)$$

Dónde:

$\hat{\Delta}$  = Estimado del sesgo del laboratorio

$\bar{y}_w$  = promedio de las mediciones realizadas por el laboratorio.

Por ser un estimado, el valor del sesgo tiene implícita cierta variación; la variación del estimado del sesgo del laboratorio se debe a la variación en los resultados del proceso de medición y se expresa por la desviación estándar calculada entre la raíz del número  $n$  de valores utilizado:

$$\sigma_{\hat{\Delta}} = \frac{\sigma_y}{\sqrt{n}} \quad (36)$$

**2.2.2 Determinación de la veracidad por medio de la recuperación:** Si no se cuenta con un valor de referencia proveniente de un material similar en composición, es necesario “fabricar” uno. La forma más común de conseguir un material de referencia cercano a la muestra a analizar es por medio de adiciones, en el mejor de los casos de sustancias puras; de ahí es en donde se establece el término de recuperación: si se está adicionando algo es necesario determinar cuánto podemos recuperar.

Para estudios de recuperación los materiales de referencia deben ser de la más alta pureza disponible.

- En el intervalo de concentraciones macro (definido como alrededor de 0.1-100%) los estándares regularmente son cercanos al 100%;
- en el intervalo micro o traza (definido como ug/g a 0.1%) y en el intervalo ultramicro o ultratrazas (ug/g y más bajo) el estándar utilizado debe ser de al menos 95% de pureza. (AOAC, 2002).

Este procedimiento es generalmente eficaz en la determinación de elementos traza, pero por ejemplo, no podría ser aplicable en muestras en donde se requiera de tratamientos agresivos para destruir la matriz y liberar el analito. Como resultado, es probable que la "recuperación" sea mayor que el correspondiente al analito nativo (en su matriz original). (Barwick, 1999). Se pueden presentar dos situaciones:

- a)** Cuando el analito es adicionado a una matriz pura es decir, que no contiene al analito; la recuperación es calculada como:

$$R = \frac{\bar{y}}{\mu} 100 \quad (37)$$

Dónde:  $\bar{y}$  = es la concentración encontrada con el método a ser validado  
 $\mu$  = es la concentración de referencia o la concentración adicionada.

- b)** El analito es adicionado a muestras que ya contienen el analito, la recuperación es calculada como:

$$R = \frac{\bar{y}_{o+s} - \bar{y}_o}{\mu} 100 \quad (38)$$

Dónde:

$\bar{y}_{o+s}$  = es la concentración obtenida para la muestra adicionada, y

$\bar{y}_o$  = es la concentración obtenida para la muestra sin adicionar.

$\mu$  = es la concentración total esperada del analito: el que contenía la muestra más el adicionado,

## 2.3 Evaluación del valor obtenido de veracidad

### 2.3.1 Evaluación de valores de sesgo de un laboratorio.

**2.3.1.1 Comparación directa con la incertidumbre o desviación estándar de un MRC:** representado por la siguiente relación:

$$\mu - \bar{y} < u \quad (39)$$

$$u = \frac{U}{2} = \frac{\delta_m}{2} \quad (40)$$

Dónde:

$\delta_m$  es la diferencia mínima entre los resultados obtenidos y esperados de MR y el valor certificado del material de referencia.

Para Materiales de Referencia Certificados,  $\delta_m$  corresponde al ancho del intervalo de la incertidumbre expandida “U” declarada para un nivel de confianza del 95%<sub>(8)</sub>.

**Criterio de aceptación:** Existen dos posibilidades:

1) Si  $|\mu - \bar{y}| \leq \frac{\delta_m}{2}$

No queda probado que el laboratorio posea un sesgo inaceptable, o

2) Si  $|\mu - \bar{y}| > \frac{\delta_m}{2}$

Queda probado que el laboratorio posee un sesgo inaceptable.

**2.3.1.2 Evaluación por intervalo de confianza.** El intervalo de confianza al 95% del sesgo de laboratorio puede expresarse como:

$$\hat{\Delta} - A_w \sigma_r \leq \Delta \leq \hat{\Delta} + A_w \sigma_r \quad (41)$$

Dónde:

$\Delta$  = sesgo del laboratorio

$\hat{\Delta}$  = sesgo estimado

$A_w$  = es una función que depende del número de mediciones (n). Se obtiene

con la siguiente formula: 
$$A_w = \frac{1.96}{\sqrt{n}} \quad (42)$$

1.96 es un valor constante para un 95 % de nivel de confianza,

$\sigma_r$  = desviación estándar de la repetibilidad. Si  $\sigma_r$  es desconocida su estimado  $s_r$  se usa en su lugar.

**Criterio de aceptación:** Si este intervalo de confianza cubre el valor de cero, el sesgo del laboratorio es insignificante para un nivel de confianza del  $\alpha=0.05$  (5%); de otro modo sí es significativo.

**2.3.1.3 Evaluación empleando el estadístico t.** La veracidad se evalúa estadísticamente comparando la media obtenida por el laboratorio y el valor de referencia; esta comparación se realiza con una prueba t. El tipo de prueba t depende del origen del valor de referencia utilizado. Se tienen dos casos principales:

**Caso a:** Se evalúa la veracidad comparando el resultado obtenido al analizar una muestra contra el valor “verdadero” establecido; para ello se requiere un material de referencia (material de referencia certificado, material de referencia interno, ensayo de aptitud o muestra adicionada). Si la incertidumbre del MR es significativa, porque el MR proviene de una fuente confiable o primaria, se debe considerar en los cálculos.

Se usa la prueba t siguiente: (ISO-5725-6:1994)

$$t = \frac{|\mu - \bar{y}|}{\sqrt{u_\mu^2 + \frac{s^2}{n}}} \quad (43)$$

Dónde:

$u_\mu$  es la incertidumbre estándar declarada para el valor de referencia. Si el valor de referencia certificado es expresado como  $\mu \pm U_\mu$  (con  $k=2$ ),  $u_\mu$  es calculado como  $U_\mu/k$ .

El valor  $t_{\text{calculado}}$  es comparado con el valor tabulado en la tabla t de dos lados; la t tabulada o t crítica es normalmente considerada para un 95 % de nivel de confianza (a menos que se decida otro nivel) y para el nivel efectivo de grados de libertad. Donde  $v_{\mu}$  son los grados de libertad asociados con  $u_{\mu}$ , esto es número de mediciones del material de referencia menos 1.

**Criterio de aceptación:** La veracidad del laboratorio es aceptable si  $t_{\text{calculada}} \leq t_{\text{critica}}$ . ((Boque et al., 2002).

**Caso b:** La incertidumbre del MR no se considera significativa o no proviene de una fuente confiable.

Para decidir si la diferencia entre  $\bar{x}$  y  $\mu$  es significativa, es conveniente calcular el estadístico t sin involucrar la incertidumbre del material de referencia con la siguiente fórmula (AOAC, 2008):

$$t = (\bar{y} - \mu) \sqrt{n} / s \quad (44)$$

Dónde:

$\bar{y}$  = media muestral

s = Desviación estándar muestral

n = tamaño de las muestra

$\mu$  = valor de referencia

**Criterio de aceptación:** Si  $|t|$  (el valor calculado de t sin tomar en cuenta el signo) es **mayor** que un cierto valor de t crítico, para el nivel de confianza deseado y grados de libertad  $v = n - 1$ , entonces se concluye que existe diferencia significativa entre ambos valores (Miller and Miller, 2002).

**2.3.1.4 Comparación con un valor de referencia utilizando un método normalizado con valores de precisión** conocidos  $\sigma_R$  y  $\sigma_r$ . Cuando se tiene un valor de referencia  $\mu_0$  para un material, obtenido por un método del cual se conocen los valores de repetibilidad  $\sigma_r$  y reproducibilidad  $\sigma_R$ ; el laboratorio puede evaluar la veracidad de los resultados obtenidos en las mediciones al mismo material a través de la diferencia entre la media de los  $n$  valores medidos  $\bar{y}$  y el valor de referencia (ISO 5725-6: 1994).

La diferencia crítica  $CD$  para  $|\bar{y} - \mu_0|$  es:

$$CD = \frac{1}{\sqrt{2}} \sqrt{(2.8\sigma_R)^2 - (2.8\sigma_r)^2 \left(\frac{n-1}{n}\right)} \quad (45)$$

Dónde:

$\sigma_R$  = desviación estándar de la reproducibilidad del método

$\sigma_r$  = desviación estándar de la repetibilidad del método

$n$  = número de mediciones de la muestra

**2.3.1.5 Comparación de la media general obtenida por el laboratorio con el valor certificado de un MR.** La media general del resultado del laboratorio puede compararse con el valor certificado del MR utilizando el siguiente ensayo estadístico:

a) Si

$$|\mu - \bar{y}| \leq 2 \sqrt{\frac{s_B^2 - \left(1 - \frac{1}{n}\right) s_r^2}{p}} \quad (46)$$

La diferencia entre la media general de los resultados del método y el valor certificado no es estadísticamente significativa;

Dónde:

$s_B^2$  = Varianza de las mediciones realizadas

$s_r^2$  = Varianza de la repetibilidad del método

$n$  = número de mediciones realizadas

$p$  = condiciones, días, analistas.

b) Si

$$|\mu - \bar{y}| > 2 \sqrt{\frac{s_B^2 - \left(1 - \frac{1}{n}\right) s_r^2}{p}}$$

La diferencia entre la media general de los resultados del método y el valor certificado es estadísticamente significativa;

**2.3.1.6 Comparación de la media general obtenida por el laboratorio con un método propuesto con el valor obtenido con un método de referencia** (11). La veracidad se determina analizando una muestra de prueba con el método de referencia (A) y con el método a ser evaluado (B). Esta muestra de prueba se analiza con ambos métodos en diferentes corridas (por ejemplo; diferentes días, diferentes operadores, etc).

La comparación se realiza siguiendo los siguientes pasos:

- Obtener un valor medio del método de referencia,  $\bar{y}_{\text{ref}}$  o  $\bar{y}_A$ , y la varianza,  $s_{\text{ref}}^2$  o  $s_A^2$ ; calculados de los  $n_A$  valores obtenidos con el método de referencia.
- Calcular un valor medio,  $\bar{y}_B$ , y una varianza,  $s_B^2$ , de los  $n_B$  valores obtenidos con el método a ser evaluado.
- La comparación entre los resultados de ambos métodos se hará mediante una prueba t; la fórmula de la prueba t utilizada para la evaluación dependerá de si la diferencia entre las varianzas obtenidas por ambos métodos son significativas o no. Para determinar esto se realiza primero una prueba F entre ambas varianzas:

$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2}$$

Dónde:  $s_1^2$  corresponde a la varianza mayor de las dos varianzas.

- Comparar el valor F calculado con el valor F tabulado obtenido de una tabla F de dos lados como  $F(\alpha, v_1, v_2)$ , para un nivel de significancia  $\alpha = 0.05$  y los grados de libertad  $v_1 = n_1 - 1$  y  $v_2 = n_2 - 1$ .

**Caso a:** Si  $F_{\text{calculado}} \leq F_{\text{tablas}} (\alpha, v_1, v_2)$ , la diferencia entre ambas varianzas no es estadísticamente significativa. Se analiza la diferencia entre las medias con la siguiente prueba t:

$$t = \frac{|\bar{y}_A - \bar{y}_B|}{\sqrt{\frac{s_B^2(n_B - 1) + s_A^2(n_A - 1)}{n_B + n_A - 2} \left| \frac{1}{n_B} + \frac{1}{n_A} \right|}} \quad (47)$$

Se compara el valor t calculado con el valor t tabulado en las tablas t de dos lados, para un nivel de significancia  $\alpha=0.05$ , y los grados de libertad  $n + n_{\text{ref}} - 2$ .

**Criterio de aceptación:**

- Si  $t_{\text{calculada}} \leq t_{\text{tablas}}$ ; no hay evidencia de que el valor medio obtenido por el laboratorio sea estadísticamente diferente del valor de referencia.
- Si por otro lado  $t_{\text{calculada}} > t_{\text{tablas}}$ , se concluye que el valor promedio obtenido por el laboratorio es significativamente diferente del valor de referencia o valor esperado

**Caso b:** Si  $F_{\text{calculado}} > F_{\text{tablas}} (\alpha, v_1, v_2)$ , la diferencia entre ambas varianzas es estadísticamente significativa. Por lo tanto, la veracidad se evalúa con la siguiente prueba t:

$$t = \frac{|\bar{y}_A - \bar{y}_B|}{\sqrt{\frac{s_B^2}{n_B} + \frac{s_A^2}{n_A}}} \quad (48)$$

Comparar la  $t_{\text{calculada}}$  con la  $t_{\text{tablas}}$  en una tabla t de dos lados, para un nivel de significancia  $\alpha=0.05$  y los grados de libertad  $v_{\text{eff}}$ , obtenidos con la aproximación de Welch-Satterthwaite (Satterthwaite, 1941).

$$v_{\text{eff}} = \frac{\left| \frac{s_A^2}{n_A} + \frac{s_B^2}{n_B} \right|^2}{\frac{s_A^4}{n_A - 1} + \frac{s_B^4}{n_B - 1}} \quad (49)$$



### Criterio de aceptación:

- Si  $t_{calculada} \leq t_{tablas.}$ ; no hay evidencia de que el valor medio obtenido por el laboratorio sea estadísticamente diferente del valor de referencia.
- Si por otro lado  $t_{calculada} > t_{tablas.}$ , se concluye que el valor promedio obtenido por el laboratorio es significativamente diferente del valor de referencia o valor esperado.

### 2.3.2 Evaluación de la veracidad obtenida por medio de estudios de recuperación.

**Método de Youden:** La veracidad obtenida puede ser verificada utilizando el método de Youden (Youden, 1947). Este consiste en estimar la recuperación constante analizando diferentes cantidades de la muestra.

- Para cada muestra de referencia la recuperación debe ser calculada realizando al menos 7 mediciones (de preferencia  $n \geq 10$ ).
- Una recuperación aparente,  $R$ , y una desviación estándar,  $s_R$ , se obtienen a partir de las  $n$  recuperaciones calculadas. La veracidad se evalúa comparando estadísticamente la media de las recuperaciones aparentes,  $R$ , con el 100%.
- Para evaluar la recuperación obtenida se puede emplear la siguiente prueba t:

$$t_{cal} = \frac{|100 - \bar{R}|}{\frac{s_R}{\sqrt{n}}} \quad (50)$$

Esta prueba t considera que la recuperación es expresada como un porcentaje y que la incertidumbre del valor de referencia no es considerable (se considera despreciable).

El valor t calculado se compara con el valor t tabulado en una tabla de dos lados, para un nivel de significancia  $\alpha=0.05$  y  $n-1$  grados de libertad.

**Criterio de aceptación:** hay dos posibilidades:

- a)  $t_{cal} \leq t_{tab}$ : la recuperación no difiere significativamente de 100% y por lo tanto la veracidad del método se considera confirmada.
- b)  $t > t_{tab}$ : la recuperación difiere significativamente de 100%, la veracidad del método no puede considerarse confirmada.

**2.3.2.1 Evaluación de la recuperación por criterios establecidos:** Una recuperación aceptable es una función de la concentración y el propósito del análisis. Algunas recuperaciones aceptables en ensayos individuales son los siguientes (AOAC, 2002):

<i>Concentración</i>	<i>Limites de recuperación</i>
100%	98-101%
10%	95-102%
1%	92-105%
0.1%	90-108%
0.01%	85-110%
10 $\mu\text{g/g}$	80-115%
1 $\mu\text{g/g}$	75-120%
10 $\mu\text{g/kg}$	70-125%

Tabla 4 Recuperación en función de la concentración

**2.3.3 Evaluación de la veracidad en intervalos de concentraciones por regresión lineal:** La metodología se basa en la comparación de los valores obtenidos para una muestra a diferentes concentraciones utilizando dos métodos diferentes: un método de referencia y un método alternativo. Se analizan n muestras por el método de referencia y por el método alternativo, la cantidad de muestras analizadas en ambos métodos debe ser la misma. A continuación se mencionan tres formas de llevar a cabo la evaluación de los resultados:

**a) Considerando muestras pareadas:** Se ordenan los datos obtenidos como muestras pareadas con los valores obtenidos por el método de referencia y por el método alternativo para cada una de las concentraciones analizadas.

Muestra / concentración	Método de referencia	Método alternativo	d
1	$y_{11}$	$y_{12}$	$d_1 = y_{11} - y_{12}$
2	$y_{21}$	$y_{22}$	$d_2 = y_{21} - y_{22}$
3	$y_{31}$	$y_{32}$	$d_3 = y_{31} - y_{32}$
...	...	...	...
p	$y_{p1}$	$y_{p2}$	$d_p = y_{p1} - y_{p2}$

Tabla 5

$$t = \frac{\bar{d}}{s_D / \sqrt{n}} \tag{51}$$

Dónde:

$$d = y_i - y_j$$

$\bar{d}$  = promedio de las diferencias “d”

$s_D$  = Desviación estándar de las diferencias “d”

n = número de mediciones pares

**Criterio de aceptación:**

Si  $|t| > t_{\alpha/2, n-1}$  existe diferencia significativa entre ambos grupos de mediciones.

**b) Por comparación visual:** Se grafican los valores obtenidos por el método de referencia contra los valores esperados y en el mismo gráfico se grafican los valores obtenidos por el método alternativo contra los valores esperados;

**Criterio de aceptación:** Visualmente se evalúa la similitud en ambas rectas; algunas veces esta comparación es suficiente.

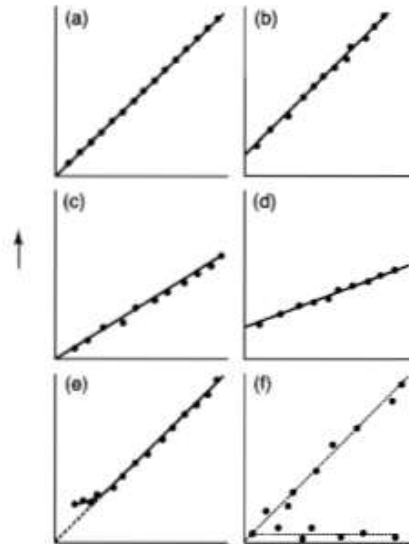


Figura 1 Gráficas de valores esperados contra valores obtenidos

(Miller y Miller, 2002)

**c) Por intervalos de aceptación para a y b:** Estadísticamente la diferencia entre ambas rectas se verifica mediante la comparación de la ordenada al origen y la pendiente obtenida en el método alternativo, contra el intervalo de aceptación en los valores de la recta obtenida para el método de referencia. El intervalo de aceptación se obtiene mediante la incertidumbre estimada para ambos parámetros:

- Obtener la ecuación representativa de la curva para el método de referencia.  $y = bx + a$
- Calcular el promedio de los residuos

$$s_{y/x} = \left[ \frac{\sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{n - 2} \right] \quad (52)$$

Donde:

$y_i$  = valores esperados para una concentración

$\hat{y}_i$  = Valores individuales calculados a partir de la ecuación de la recta obtenida.

$y_i - \hat{y}_i$  = Residuos de y

- La desviación estándar para la pendiente  $s_b$  se calcula como:

$$s_b = \frac{S_{y/x}}{\left[ \sum_i (x_i - \bar{x})^2 \right]} \quad (53)$$

Dónde:

$S_{y/x}$  = promedio de los residuos

$\bar{x}$  = media (promedio)

$X_i$  = mediciones individuales

- El intervalo de aceptación para la pendiente es:  $b \pm s_b$ ; la pendiente obtenida en la recta para el método alternativo deberá estar dentro de estos valores.
- La desviación estándar para la ordenada al origen se calcula como:

$$s_a = s_{y/x} \left[ \frac{\sum_i x_i^2}{n \sum_i (x_i - \bar{x})^2} \right] \quad (54)$$

Los símbolos son los mismos que en la ecuación anterior;  $n$  = número de puntos (concentraciones) medidos en la recta

- El intervalo de aceptación para la ordenada al origen es:  $a \pm s_a$ ; la ordenada al origen de la ecuación correspondiente al método alternativo deberá estar dentro de este intervalo.

**d) Gráfica de los valores obtenidos por el método alternativo contra los del método de referencia:**

- Cada uno de resultados obtenidos por el método de prueba se grafica contra su equivalente valor del método de referencia
- Se verifica visualmente la linealidad de la recta: la ordenada al origen ( $a$ ) debe corresponder al cero y la pendiente ( $b$ ) debiera ser un ángulo recto. Esto es, que de no existir diferencia entre ambos métodos  $b=1$  y  $a=0$ ; la recta ideal tomaría la siguiente forma  $x = y$

- Para verificar lo anterior se calcula la pendiente:

$$b = \frac{\sum_i (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sum_i (x_i - \bar{x})^2} \quad (55)$$

- Y la ordenada al origen.

$$a = \bar{y} - b\bar{x} \quad (56)$$

- Si la pendiente no es igual a 1 y/o la ordenada al origen no es igual 0, se deberá probar qué tan diferentes son los valores obtenidos; esto es, qué tan diferente de cero puede ser a y que tan diferente de 1 puede ser b.

- Para probar si b es significativamente diferente de  $\beta=1$ , se calcula:

$$t = \frac{b - \beta}{\sqrt{1 - r^2}} \sqrt{n - 2} \quad (57)$$

- Para probar que a es significativamente diferente de  $\alpha=0$ , se calcula:

$$t = \frac{a - \alpha}{s_a^2} \quad (58)$$

En ambos casos se compara la t calculada contra la t crítica de tablas para dos lados y un 95% de nivel de confianza. Grados de libertad  $v=n-1$

**Criterio de aceptación:** Si t calculada es menor que t crítica, se concluye que estadísticamente no hay diferencia entre ambos métodos, los valores obtenidos por los diferentes métodos no son significativamente diferentes.

## 2.4 Ejemplos de aplicación:

Tomando los datos presentados en la Tabla A.3 Nivel 4, NMX.CH-5725-4-IMNC-2006

Media de la medición	Mn en mineral (% w/w)
1	0.79425
2	0.76875
3	0.75675
4	0.76425
5	0.775
6	0.78
7	0.7575
8	0.7655
9	0.765
10	0.741
11	0.78625
12	0.78375
13	0.78
14	0.797
15	0.77625
16	0.763
17	0.7725
18	0.77125
19	0.774

Valor de referencia aceptado:

0.777 % Mn

Desviación estándar de la reproducibilidad:

$S_R$ : 0.01385

Con estos datos se define el intervalo de aceptación:

0.76315 – 0.79085

Se determinan las estadísticas de los datos:

- Promedio: 0.7722
- Desviación estándar (s): 0.01347
- Sesgo (contra el valor de referencia): 0.00479

Comentario:

Analizando el promedio de los valores éste se encuentra dentro del intervalo definido con los datos del material de referencia, se puede concluir que el valor obtenido es aceptable.

- a) Comparación con intervalo de aceptación definido por la incertidumbre del valor de referencia:

El promedio se encuentra dentro del intervalo de aceptación

$$\Delta = \mu - \bar{y} < u (S_R)$$

$$\Delta = 0.777 - 0.7722 = 0.0048 < 0.01385$$

La diferencia entre ambos valores es menor que la incertidumbre declarada.

- b) Prueba de Hipótesis  $H_0: \mu = \mu_0$

- Considerando la incertidumbre del material de referencia no significativo

$$t_{calculada} = \frac{\bar{x} - \mu_0}{s / \sqrt{n}} = \frac{0.7722 - 0.777}{0.013 / \sqrt{19}} = -1.550$$

T tablas,  $\alpha: 0.05$ ,  $v: 18 = 2.1009$

La t calculada es menor que la t crítica, por lo tanto el resultado de las mediciones no se considera diferente del valor de referencia establecido.

- Considerando la incertidumbre del material de referencia significativo

$$t = \frac{|\mu - \bar{y}|}{\sqrt{u_{\mu}^2 + \frac{s^2}{n}}} = \frac{|0.777 - 0.7722|}{\sqrt{(0.01385)^2 + \frac{(0.013)^2}{19}}} = 0.3375$$

T tablas,  $\alpha: 0.05$ ,  $v: 18 = 2.1009$

Aun considerando la incertidumbre del material de referencia, la t calculada es menor que la t crítica, el resultado de las mediciones no se considera diferente del valor de referencia establecido. La t calculada es bastante menor que la obtenida sin considerar la incertidumbre debido a que al introducir la incertidumbre del material de referencia en la fórmula el intervalo de aceptación de los valores se expande y aumenta la posibilidad de que los valores estén dentro del intervalo de aceptación.



**c) Intervalo de confianza**

El intervalo de confianza al 95% del sesgo de laboratorio puede expresarse como:

$$\hat{\Delta} - A_w \sigma_r \leq \Delta \leq \hat{\Delta} + A_w \sigma_r \quad \text{Dónde:} \quad A_w = \frac{1.96}{\sqrt{n}} = \frac{1.96}{\sqrt{19}} = 0.44965$$

El intervalo para los valores del ejemplo quedaría definido como:

$$\begin{aligned} -0.0048 - (0.44965)(0.01347) &\leq \Delta \leq -0.0048 + (0.44965)(0.01347) \\ -0.01084 &\leq \Delta \leq 0.00127 \end{aligned}$$

El intervalo de confianza cubre el valor de cero, el sesgo del laboratorio es insignificante para un nivel de confianza de  $\alpha=0.05$  (5%).

## 2.5 Conclusiones:

Para la determinación del sesgo se tiene una sola fórmula, pero varias herramientas para evaluar el sesgo obtenido.

En los ejemplos se observa que si el sesgo obtenido es aceptable utilizando una de las herramientas, también lo es con las otras herramientas sugeridas; esto es; es posible utilizar cualquiera de las metodologías descritas y se tendrán resultados similares.

## TEMA II

### PARÁMETROS DE APLICACIÓN: ALCANCE DEL MÉTODO DE PRUEBA

#### Introducción al tema:

Una de las características que debe de establecerse al momento de implantar o desarrollar un método de prueba analítico es el intervalo de concentraciones en el cual es válido su uso.

En la mayoría de los métodos analíticos este intervalo de concentraciones está definido con el **Intervalo lineal** de la curva de calibración, en donde se representa el comportamiento de las lecturas con una línea recta., de forma que es posible relacionar la señal o medición obtenida con una concentración.

Este intervalo puede iniciar con el **límite de detección** en aquellos métodos en donde se requiere analizar concentraciones muy bajas (residuales) o con el **límite de cuantificación** cuando las concentraciones están suficientemente alejadas del límite de detección.

Estos parámetros: el intervalo lineal, el límite de detección y el límite de cuantificación, definen el “alcance del método” en el laboratorio bajo las condiciones particulares establecidas para el propósito.

## 1.0 INTERVALO LINEAL.

### 1.1 Definiciones

**1.1.1 Intervalo:** el intervalo de un procedimiento analítico es el intervalo entre la más baja y la más alta concentración (cantidad) de un analito en la muestra (incluyendo estas concentraciones) para las cuales se ha demostrado que el procedimiento analítico tienen un adecuado nivel de precisión, exactitud y linealidad (ICH Q2, 2005).

**1.1.2 Linealidad:** La linealidad de un procedimiento analítico es su habilidad (dentro de un intervalo) para obtener resultados de prueba directamente proporcionales a la concentración (cantidad) de un analito en la muestra (ICH Q2, 2005).

**1.1.3 Intervalo de medición:** intervalo de trabajo, conjunto de valores de cantidades del mismo tipo que pueden ser medidos usando un sistema de medición o con un instrumento de medición con una incertidumbre de la medición instrumental específica, bajo condiciones definidas.

Nota: el límite inferior del intervalo de medición no debe ser confundido con el imite de detección.

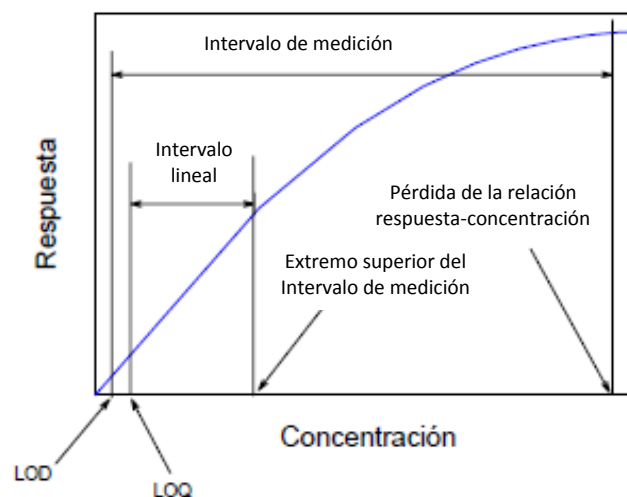


Figura 2: Intervalo lineal y de medición (Olivieri, 2002)

## 1.2 Determinación del intervalo lineal y/o de trabajo.

Para cualquier método cuantitativo, es necesario determinar el intervalo de concentraciones del analito sobre los cuales el método puede ser aplicado.

En el límite inferior del intervalo de concentración los factores limitantes son los valores de los límites de detección y/o los límites de cuantificación. En el extremo superior del intervalo de concentración los límites suelen ser impuestos por factores como la respuesta del instrumento o el comportamiento del sistema.

Dentro del intervalo de trabajo puede existir un intervalo de respuesta lineal, lo que es ideal para el trabajo del laboratorio, ya que dentro del intervalo lineal la señal de respuesta tendrá una relación lineal con la concentración del analito, como la expresa la ecuación de la recta.

$$y = bx + a \quad (59)$$

Dónde:

$y$  = respuesta, valor obtenido

$x$  = concentración esperada

$a$  = pendiente de la recta

$b$  = ordenada al origen

La extensión de este intervalo lineal puede definirse durante la evaluación del intervalo de trabajo. La linealidad puede ser estudiada por medio de la función de calibración en mediciones instrumentales, o puede ser investigada para los métodos en su totalidad a partir de la determinación de la veracidad a través de diferentes concentraciones del analito (INAB PS15, 2012)

Ya que la forma ideal de la curva de calibración es una línea recta, el método más recomendado para la determinación de la linealidad es por medio de la determinación de la ecuación de la recta.

### 1.2.1 Método de mínimos cuadrados.

- Se realizan una serie de mediciones a diferentes concentraciones del analito, es recomendable que las mediciones sean realizadas en cada concentración al menos por duplicado.
- Los datos resultantes se grafican colocando en el eje de las abscisas las concentraciones esperadas y en el eje de las ordenadas las lecturas (valores) obtenidos.
- Para obtener la ecuación de la recta se utilizan las siguientes ecuaciones:

$$a = \bar{y} - b\bar{x}$$

$$b = \frac{\sum_i (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}$$

Dónde:

$\bar{y}$  = media o punto medio de los valores de y

$\bar{x}$  = media o punto medio de los valores  $x_i$

$y_i$  = valores individuales de y

$x_i$  = valores individuales de x

A pesar de lo complejas que pueden parecer las fórmulas, éstas son de un uso tan generalizado que la mayoría de las calculadoras científicas y los programas de computadoras más utilizados cuentan con estas funciones, lo que simplifica bastante los cálculos requeridos.

Para análisis instrumentales, y a menos que en la normatividad usada por el laboratorio se especifique otra cosa, IUPAC recomienda el siguiente protocolo:

- Deben utilizarse seis o más estándares de calibración incluyendo un blanco o un estándar de calibración con una concentración cercana a cero; AOAC recomienda un mínimo de 5 muestras (ICH Q2, 2005) y la guía Euraquem menciona 10 muestras a diferentes concentraciones (Eurachem, 2014).

- Los estándares de calibración deben estar igualmente espaciados sobre el intervalo de concentración de interés. Idealmente las diferentes concentraciones deben ser preparadas de forma independiente y a partir de alícuotas de la misma solución concentrada.
- El intervalo debe cubrir de 0 a 150%, de 50–150% o del 80% a 120% (González, Herrador 2007) de la(s) concentración (es) de rutina o esperada (s); dependiendo de cuál intervalo se considera más adecuado al uso previsto y recursos del laboratorio (equipo, estándares de referencia y material volumétrico) ; y
- Los estándares de calibración deben ser leídos al menos por duplicado, de preferencia por triplicado o más, en un orden al azar (IUPAC, 2002).

**1.2.2 Linealidad en métodos no instrumentales:** Para análisis no instrumentales, la linealidad puede ser determinada seleccionando diferentes concentraciones (baja, media y alta) de estándares. El nivel más bajo de concentración debe ser aproximadamente el límite de cuantificación y pueden ser utilizados los niveles medios (intermedios) y altos que se deseen para lograr mejor definición del comportamiento. Los resultados son graficados en forma de una “curva de respuesta” (NATA, 2012).

**1.2.3 Determinación de parámetros de validación por medio de la linealidad.** Si se realizan varias mediciones en cada concentración, los datos de calibración pueden ser utilizados para determinar la precisión en diferentes niveles de concentración. Para el cálculo de la precisión cada concentración de la curva debiera ser preparada al menos tres veces.

Por otro lado, como se vio anteriormente, a partir de los datos obtenidos en los niveles bajos de concentración es posible determinar el límite de cuantificación.

### 1.3 Evaluación de la linealidad

**1.3.1 Por evaluación visual.** El gráfico obtenido a partir de las diferentes concentraciones y la respuesta instrumental es analizado a fin de establecer si es posible trazar una línea recta que pasa por los diferentes puntos.

La inspección visual deberá verificar la ausencia de curvaturas en el intervalo de interés, la necesidad de utilizar intervalos más cortos e incluso si la línea pasa a través de varios puntos, lo que nos da evidencia de la presencia de residuales significativos. Esta prueba, a pesar de su simplicidad, es la más recomendada para evaluar linealidad.

**1.3.2 Por medio del coeficiente de correlación (R).** Para estimar la bondad con que se ajustan los puntos de una curva de calibración a una línea recta se calcula el coeficiente de correlación momento-producto,  $r$ . Para simplificar, a este estadístico se le denomina “coeficiente de correlación” (Miller y Miller, 2002).

El valor de  $r$  se obtiene con la siguiente formula:

$$r = \frac{\sum_l [(x_l - \bar{x})(y_l - \bar{y})]}{\left\{ \left[ \sum_i (x_i - \bar{x})^2 \right] \left[ \sum_i (y_i - \bar{y})^2 \right] \right\}^{1/2}} \quad (60)$$

Dónde:

$\bar{y}$  = media o punto medio de los valores  $y_i$

$\bar{x}$  = media o punto medio de los valores  $x_i$

$y_i$  = valores individuales de  $y$

$x_i$  = valores individuales de  $x$

**Criterio de aceptación:** Un coeficiente de relación alto (>0.99) es recomendado como evidencia de una buena relación concentración-lectura resultante. Aunque, por sí solo, el uso del coeficiente de relación no es del todo correcto para evidenciar una prueba de linealidad; debe complementarse la confirmación de la linealidad mediante evaluación visual de la recta obtenida (AOAC, 2002).

### 1.3.3 Evaluación del coeficiente de correlación mediante t de Students:

Como se mencionó en 1.3.2, el uso del coeficiente de correlación no es suficiente para evaluar la linealidad; la evacuación visual puede ser un buen complemento, pero no permite una evaluación objetiva ya que depende del criterio de quién la realiza.

Una buena opción para evaluar el coeficiente de correlación es mediante la t de Student, de esta forma se compara el valor obtenido contra el valor ideal de correlación de 1 bajo un nivel de confianza establecido.

La fórmula para hacer esta relación es la siguiente:

$$t_{calculada} = \frac{|r|\sqrt{n-2}}{\sqrt{1-r^2}} \quad (61)$$

Dónde:

r = Coeficiente de correlación obtenido

n = número de puntos utilizados para hacer la regresión

**Criterio de aceptación:** Se compara contra t de tablas para  $v = n-1$  y nivel de confianza del 95%, a menos que se requiera establecer otro nivel de confianza.

La hipótesis nula  $H_0$  es que no existe correlación entre los valores de x y los valores y obtenidos; por consiguiente, la hipótesis alterna  $H_i$  es que sí existe relación entre ambos grupos de valores.

- Si  $t_{calculada}$  es mayor que t de tablas se rechaza la hipótesis nula, lo que significa que sí existe correlación y por lo tanto el coeficiente de correlación es aceptable.
- En caso contrario, si  $t_{calculada}$  es menor que t de tablas se acepta la hipótesis nula, el coeficiente de correlación calculado no es aceptable.

**1.3.4 Mediante el coeficiente de variación (CV) del factor de respuesta (fi):** La linealidad puede ser evaluada mediante el coeficiente de variación del factor de respuesta; definido éste como el cociente entre la respuesta dada por el instrumento y el valor de la concentración del material de referencia.



$$f_i = \frac{C_{obtenida}}{C_{esperada}} \quad (62)$$

$$f_m = \Sigma f_i / n \quad (63)$$

$$CV(\%) = \frac{DE(100)}{f_m} \quad (64)$$

Dónde:

$f_i$  = factor de respuesta

$f_m$  = promedio del factor de respuesta

$n$  = número de materiales de referencia utilizados

$CV$  = coeficiente de variación, en porcentaje

$DE$  = desviación estándar de los valores obtenidos de  $f_i$

**Criterio de aceptación:** Un resultado del coeficiente de variación del factor de respuesta próximo o menor al 10% confirma el ajuste de los datos al modelo lineal (RPS-Qualitas, 2006).

**1.3.5 Mediante el gráfico del factor de respuesta contra la concentración esperada:** Los factores de respuesta ( $f_i$ ) obtenidos (respuesta del instrumento/concentración esperada) se grafican en el eje de las ordenadas “y”, y la correspondiente concentración en el eje x.

**Criterio de aceptación:** la línea obtenida debe presentar una pendiente lo más cercano a cero (horizontal) sobre el rango de concentración. Este comportamiento es el esperado si las respuestas siguen un modelo lineal.

A manera de límites de control, dos líneas paralelas pueden ser dibujadas: una a 0.95 veces el promedio de los factores de respuesta y otra a 1.05 veces. Si no se presentan intercepciones en estas líneas, entonces se puede establecer que el intervalo lineal aplica a todo el intervalo que se está evaluando (González et al., 2007).

**1.3.6 Por medio del gráfico de los residuos:** Los residuos, obtenidos de la resta del valor obtenido menos el valor esperado en un punto, se grafican en el eje “y” frente a los valores esperados en el eje “x”;

Cuando se dispone de bastantes puntos, los gráficos de residuos permiten estimar la presencia de puntos anómalos, la linealidad de la relación y en general el comportamiento de los residuos (Ramis et al., 2001)

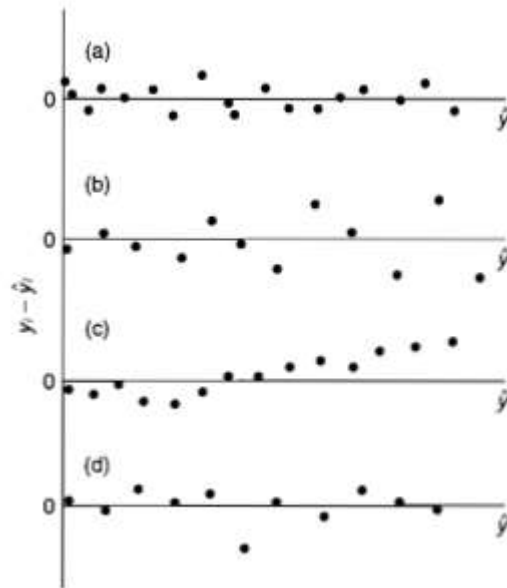


Figura 3. Gráficos de residuos (Miller, Miller 2002)

**Criterio de aceptación:**

La figura 3 muestra el análisis del comportamiento de los residuos para varias regresiones:

- (a) Distribución satisfactorio de los residuos; arriba y debajo de la línea de cero en proporción parecida y sin tendencias o secuencias de puntos.
- (b) Los residuos tienden a crecer conforme crece el valor obtenido; sería adecuado seccionar el intervalo.
- (c) Los residuos muestran tendencia, primero a ser negativos luego cruzan la línea de cero y después se hacen cada vez más positivos a medida que crece el valor obtenido; se sugiere buscar otra función (ecuación) para la curva de calibración.

- (d) En general es un gráfico satisfactorio, aunque presenta la evidencia de un dato anómalo que sería aconsejable investigar.

**1.3.7 Métodos alternativos:** Si una relación lineal no puede ser evidenciada por algunas de las formas antes descritas, el laboratorio puede elegir cualquiera de las siguientes estimaciones:

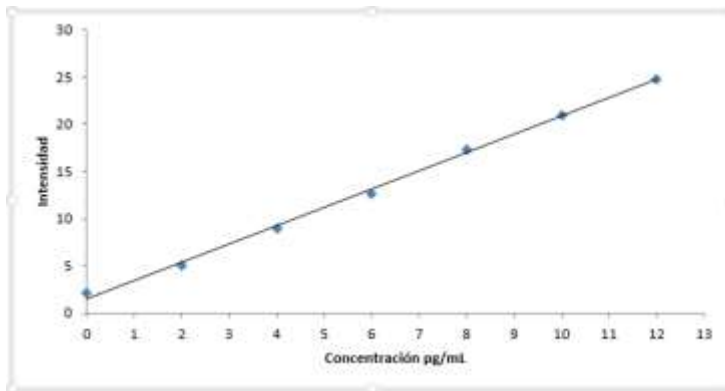
- Reducción del intervalo de medición utilizado: se toma sólo el intervalo lineal, una vez establecido el nuevo intervalo se debe realizar de nuevo el estudio mediante el método elegido.
- Descripción de una relación lineal por partes, con la diferencia de coeficientes de gradiente que se está evaluando.
- Determinación de una relación polinomial de segundo o tercer orden, así como el consecuente análisis de residuos; demostrar la normalidad requiere de un mínimo de 9 a 12 puntos; funciones polinomiales de cuarto nivel en adelante normalmente no son comunes (INAB PS15, 2012).

#### 1.4 Ejemplos de aplicación:

Se toman los datos del ejercicio 5.3.1 del libro: Estadística y Quimiometria para química analítica. Miller and Miller.

$x_i$	$y_i$
0	2.1
2	5.0
4	9.0
6	12.6
8	17.3
10	21.0
12	24.7

a) Evaluación visual



Visualmente la relación es lineal

b) Coeficiente de correlación

$$r = \frac{\sum_i [(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})]}{\left\{ \left[ \sum_i (x_i - \bar{x})^2 \right] \left[ \sum_i (y_i - \bar{y})^2 \right] \right\}^{1/2}} = 0.9988;$$

El coeficiente de correlación corresponde con la evaluación visual, demostrando una relación prácticamente lineal.

c) Evaluación del coeficiente de correlación mediante t de Students:

Hipótesis nula  $H_0$ : No existe relación,

Hipótesis alterna  $H_1$ : existe relación.

$$t_{calculada} = \frac{|r| \sqrt{n-2}}{\sqrt{1-r^2}} = \frac{|0.9988| \sqrt{7-2}}{\sqrt{1-(0.9988)^2}} = 47.19$$

T de tablas para un 95% de confianza y 6 grados de libertad  $(n-1) = 2.45$

Dado que t calculada es mayor que t de tablas se rechaza  $H_0$  y, por lo tanto, se acepta  $H_1$ : Si existe correlación lineal.

**d) Coeficiente de variación (CV) del factor de respuesta ( $f_i$ ):**

- Se requiere determinar la ecuación de la línea recta: se puede obtener con las formulas 55 y 56 o, como en esta ocasión, por medio de la función de Excel o cualquier otro programa.

La ecuación que representa la recta es:  $y = 1.9304x - 1.5179$

- Se sustituyen en la ecuación cada uno de los valores de  $x_i$  para obtener los valores de  $y_i$ ,
- Se divide el valor de  $y$  obtenido entre el valor esperado para determinar  $f_i$

$$f_i = \frac{C_{obtenida}}{C_{esperada}}$$

En la siguiente tabla se muestran los resultados obtenidos:

$x_i$	$y_i$	$y_i$ obtenida	$f_i$
0	2.1	1.1579	0.72281
2	5.0	5.3787	1.075
4	9.0	9.2395	1.0266
6	12.6	13.1003	1.0397
8	17.3	16.9611	0.9804
10	21.0	20.8219	0.9915
12	24.7	24.6827	0.9993

- Se determina el factor de respuesta promedio

$$fm = \sum f_i / n = 6.8361 / 7 = 0.9765$$

- y el coeficiente de variación

$$CV(\%) = \frac{DE(100)}{fm} = (0.1165) (100) / 0.9264 = 11.9323$$

Un resultado del coeficiente de variación del factor de respuesta próximo o menor al 10% confirma el ajuste de los datos al modelo lineal; el coeficiente de variación es ligeramente mayor de 10%, lo que no coincide con los resultados obtenidos en las metodologías anteriores.

Como una forma de hacer un estudio más detallado, y para evaluar si alguno de los puntos está fuera de la relación lineal, se utiliza la gráfica de factores.

e) Gráfico del factor de respuesta contra la concentración esperada

$x_i$	$f_i$
0	0.72281
2	1.07574
4	1.026611
6	1.039706
8	0.98041
10	0.991519
12	0.9993

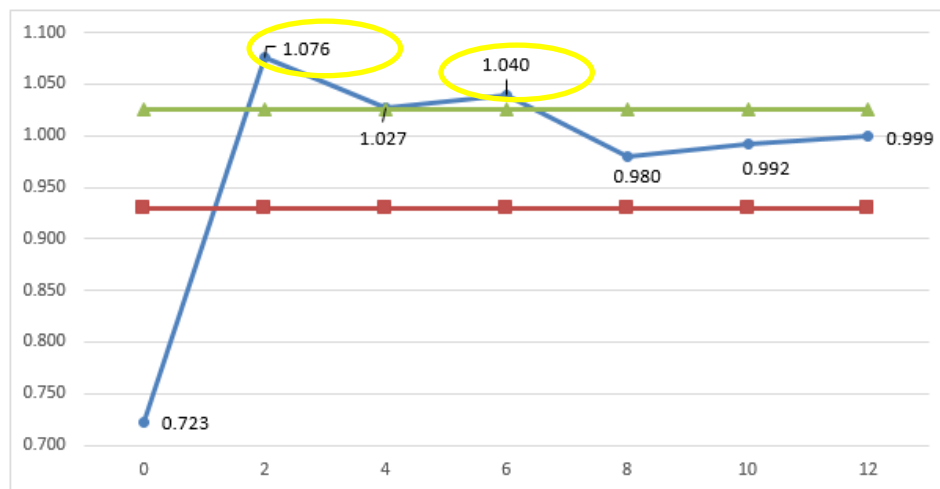
Se grafica la concentración esperada contra el factor de respuesta.

Se colocan en la gráfica líneas de control a 0.95 y 1.05 por ciento del promedio de los factores de respuesta.

$f_i$  promedio = 0.977

$(f_i)(0.95) = 0.927$

$(f_i)(1.05) = 1.025$



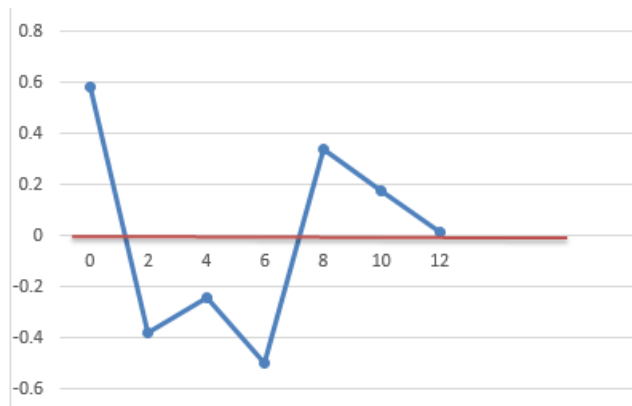
En la gráfica se observa que hay dos puntos que están fuera de las líneas de control establecidas; esta puede ser la razón por la cual el coeficiente de variación dio por arriba del criterio; lo que también indica que estos métodos son más sensibles a valores “fuera de”. Se sugiere que antes de eliminar estos puntos sean analizados individualmente.

f) Gráfico de los residuos.

- Al igual que en la metodología del coeficiente de variación se requiere determinar la ecuación de la línea recta que relaciona a los datos.
- Se sustituyen los valores de  $x_i$  para calcular las  $y_i$  esperadas.
- Se hace la resta del valor esperado menos el valor obtenido para determinar los residuos como se muestra en la siguiente tabla:

$x_i$	$y_i$ obtenida	$y_i$ esperada	Residuos
0	2.1	1.1579	0.5821
2	5.0	5.3787	-0.3787
4	9.0	9.2395	-0.2395
6	12.6	13.1003	-0.5003
8	17.3	16.9611	0.3389
10	21.0	20.8219	0.1781
12	24.7	24.6827	0.0173

- se realiza una gráfica respetando los signos (positivo o negativo):



En este ejemplo se tienen pocos puntos para verificar tendencias, aunque al parecer éstos se encuentran por arriba y debajo de la línea de cero, lo que confirma el comportamiento lineal.

## 1.5 Conclusiones.

Los métodos tradicionales para establecer linealidad (visual, mínimos cuadrados y coeficiente de correlación) pueden ser útiles para hacer también la evaluación del parámetro, sobre todo si se usan juntos; sin embargo, los laboratorios suelen tener problemas para establecer criterios de aceptación objetivos cuando estos no están descritos en los métodos de referencia.

Por ejemplo: la confirmación visual depende mucho del criterio de la persona que lo realiza y se ve afectado por el número de puntos utilizado; en cuanto al coeficiente de correlación no hay un criterio reconocido general de cuál debe ser el mínimo valor aceptado.

La prueba t es una herramienta sencilla, que confirma los resultados visuales y del coeficiente de correlación bajo un criterio basado en niveles de confianza. Más aun, mediante el uso de los coeficientes de variación se puede tener un criterio más estricto, en donde es incluso posible identificar aquellos puntos en donde la linealidad no se cumple.

Una conclusión importante es que mediante los ejemplos prácticos realizados se ha confirmado que las herramientas para evaluar los resultados no se contradicen, confirman la aceptación de los valores obtenidos, por lo que los laboratorios pueden utilizar cualquiera de ellas para su estudio.



## 2.0 LIMITE DE DETECCION.

### 2.1 Definiciones.

**2.1.1** Límite de detección medido en un valor cuantitativo, obtenido para un método de medición dado, para el cual la probabilidad de declarar falsamente la ausencia de un componente en un material es  $\beta$ , dada una probabilidad  $\alpha$  de declarar falsamente su presencia.

Nota 1 IUPAC recomienda valores para  $\alpha$  y  $\beta$  de 0.05.

**2.1.2** El límite de detección de un procedimiento analítico es la cantidad más baja de un analito en una muestra la cual puede ser detectada pero no necesariamente cuantificada como un valor exacto. (ICH Q2 2005)

$$\text{Medición (Y)} = Y_i - Y_{bl} \quad Y_i \neq Y_{bl} \quad ; \quad Y_i - Y_{bl} \neq 0$$

**2.1.3 Límite de detección (en análisis):** mínimo valor simple resultante, con una probabilidad establecida, que puede ser distinguido de una muestra de blanco adecuada. El límite define el punto en el cual el análisis se vuelve posible, y de esta manera es diferente del límite más bajo del intervalo analítico determinado. (IUPAC Gold Book, 2012)

**2.1.4** El límite de detección es la más baja concentración de un analito que puede ser detectada y confiablemente distinguida de cero (o del nivel de ruido del sistema), pero no necesariamente cuantificada; la concentración a la cual un valor medido es mayor que la incertidumbre asociada con él (González et al., 2007).

**2.1.5 Límite de Detección Relativo:** la más pequeña cantidad de material detectable (criterio  $3\sigma$ ) en una matriz, relativa a la cantidad de material analizado — puede ser dado en fracción atómica, en peso o en fracción molar (IUPAC Gold Book 2012).

## 2.2 Determinación del límite de detección.

Se pueden describir varias metodologías para estimar el límite de detección, algunas de ellas dependen de si el método es instrumental o no.

**2.2.1 Por observación visual:** El principio de la estimación visual es simple: el laboratorio realiza mediciones a niveles de concentración cada vez menores hasta llegar a aquella concentración en la cual no le es posible detectar el analito.

La medición se realiza tomando como punto de partida una concentración baja; si al analizarla es posible detectar la concentración se toma una segunda concentración más baja que la primera; de esta manera se van reduciendo las concentraciones en la medida en que los recursos lo permiten hasta llegar a aquella en la cual no se detecta la cantidad conocida. El límite de detección se toma como la concentración previa a la no detectada. Este método puede ser utilizado tanto en métodos instrumentales como en aquellos que no lo son.

Esta determinación es muy realista; pero puede ser muy lenta si no se tiene conocimiento de los límites aproximados del método, éstos pueden ser obtenidos de bibliografía reconocida del tema, estimaciones a partir de los límites del instrumento o por experiencia del laboratorio.

Esta metodología suele ser sensible a variaciones en el proceso, como analista y calibraciones, lo que puede ocasionar límites de detección diferentes si cambian las condiciones de trabajo. En este caso lo más adecuado es obtener y reportar un valor medio de los límites incluyendo valores de dispersión para los datos obtenidos.

### **Criterio de aceptación:**

Este es el método más aceptable para la determinación del límite de detección, siendo incluso recomendado para verificar los límites obtenidos por métodos estadísticos en donde se involucran probabilidades. Es aconsejable, una vez determinado el límite de detección bajo ciertas condiciones, realizar los cambios que pueden presentarse en el proceso (diferente analista, calibración, reactivos, etc.), obtener el valor promedio y presentarlo junto con la desviación estándar de los valores.

**2.2.2 Por la señal de ruido:** La determinación de la relación señal-ruido es desarrollada comparando señales obtenidas de mediciones de muestras con concentraciones bajas del analito con mediciones de muestras de blancos.

Esta estimación sólo se puede aplicar a métodos analíticos que presentan una línea base de ruido.

Los pasos a seguir son:

- Se preparan muestras en concentraciones lo más bajo posible, de acuerdo a los recursos del laboratorio, estas lecturas deben presentar una buena repetibilidad, se puede tomar como referencia la obtenida en la determinación de la precisión.
- Se preparan también muestras libres del analito, blancos, que den lecturas diferentes de cero.
- Se hace una relación entre el promedio de las lecturas de las muestras y el promedio de la lectura de los blancos.
- Se establece de esta forma la mínima concentración a la cual el analito puede ser realmente detectado.

**Criterios de aceptación:**

- Una relación señal-ruido entre 3 o 2:1 es generalmente considerada aceptable para estimaciones del límite de detección (ICH Q2, 2005). La señal producida por la concentración más baja posible debe ser dos a tres veces la señal obtenida por los blancos
- Otra forma de estimar el límite de detección es considerar como tres veces el nivel de ruido para técnicas que registran resultados en forma continua (instrumentales) (ICH Q2, 2005).

**2.2.3 En base a la desviación estándar:** El límite de detección es un valor que evidencia la presencia de un analito con un cierto nivel de probabilidad.

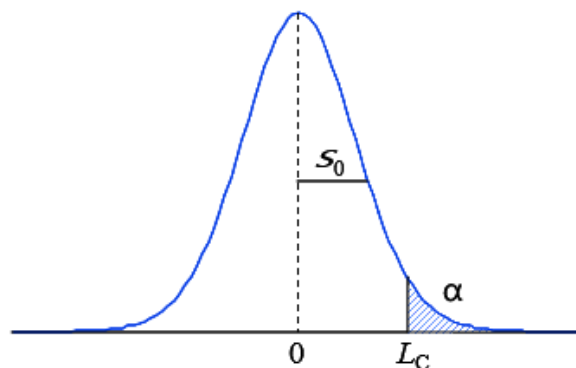
Cuando se trabaja con probabilidades se requiere establecer un nivel de confianza, y en complemento, un nivel de significación “ $\alpha$ ”; el laboratorio debe adoptar un nivel  $\alpha$  de compromiso, ni demasiado bajo ni muy alto.

En esta metodología se busca leer varias veces muestras que no contienen al analito, esto es muestras “blanco”; al analizar estas muestras son comunes los dos casos que se exponen a continuación:

**2.2.3.1 Muestras de blancos que presentan valores diferentes de cero:** Cuando se analizan muestras de “blancos”, se espera no tener ninguna señal atribuible al analito en cuestión, sin embargo no siempre es así; es común que tengamos valores diferentes de cero en las lecturas de los blancos.

Estos valores pueden ser atribuibles principalmente al ruido de los instrumentos (como en el método anterior) y a la incertidumbre propia del proceso de preparación de las muestras.

En una serie de mediciones de blancos, para un método ya establecido, es posible suponer comportamiento de los valores de los blancos en forma normal, representándolos mediante una curva de comportamiento normal.



Distribución de valores alrededor de cero

Como lo muestra la figura 4, la media esperada es de cero, pero generalmente se presentan una serie de valores tanto positivos como negativos hacia los extremos. La zona de interés para el límite de detección es la correspondiente a los valores positivos, en donde se establecerá un nivel de confianza a partir de donde aumenta la probabilidad de que el valor obtenido sea diferente de cero.

A esta zona se le conoce como aquella en donde es más probable que se cometa el error de declarar la presencia del analito aun cuando se sabe que no lo contiene, es por ello que se le conoce como error de tipo “ $\alpha$ ” o falso positivo.

Durante años se ha utilizado y se sigue utilizando el criterio “ $3\sigma$ ” o “ $3s$ ”, que de acuerdo a la curva representa un 99.87 % de nivel de confianza.

Al utilizar el criterio “ $3s$ ”; la probabilidad de cometer un error  $\alpha$ , falso positivo, es igual al área bajo esta zona dentro de la campana de Gauss; si el nivel de confianza para tres desviaciones estándar es de 99.87%, la zona correspondiente a  $\alpha$  es de 0.13% o 0.0013: esta es la probabilidad de que un blanco produzca una señal que haga suponer la presencia del analito, esto es, la detección del analito.

De lo anterior se deduce que el límite de detección puede ser expresado de la siguiente forma:

$$Y_{LOD} = Y_{\text{blanco}} + 3\sigma_{\text{blanco}} \quad (65)$$

Dónde:  $Y_{\text{blanco}}$  es el valor promedio de las señales del blanco, y

$\sigma_{\text{blanco}}$  es la desviación estándar de las lecturas.

**2.2.3.2** Muestras de blancos con valores de cero: Cuando las muestras de blancos no producen respuesta se toman muestras fortificadas a concentraciones bajas los más cercano al límite.

Dado que los valores promedio son concentraciones conocidas bajas, la expresión se reduce a:

$$Y_{LOD} = 3\sigma_{\text{mediciones}} \quad (66)$$

**Consideraciones:** Cuando el límite de detección para la validación de un método de prueba, es calculado como  $3\sigma$  o  $3s$ , se recomienda que la desviación estándar estimada sea obtenida con al menos 6 mediciones de la concentración del analito completamente independientes, en una matriz típica del blanco, o a muy bajas concentraciones cuando no se obtiene señal del blanco o se tienen resultados negativos (IUPAC, 2002).

**Criterio de aceptación:** La aceptación del valor obtenido, dado que es una estimación, dependerá de los límites prácticos del laboratorio y de la comprobación de este límite por medio del método visual.

**2.2.4 Determinando Límite de detección y límite de decisión o criterio  $\alpha=\beta=5\%$ :** el criterio  $3s$  es muy sencillo, pero sólo se ocupa del error  $\alpha$  o riesgo de falso positivo, y no dice nada del error  $\beta$  o riesgo de falso negativo. La solución consiste en definir dos límites, ver figura 5:

- a) Un límite llamado límite de decisión " $L_C$ ", donde se tome la decisión de aceptar o rechazar la presencia del analito con un error suficientemente pequeño.
- b) Otro límite llamado límite de detección " $L_D$ ", en el que, habiendo aceptado ya la presencia del analito, la señal se encuentre a suficiente distancia por encima del límite de decisión como para que el error  $\beta$  sea lo suficientemente pequeño.

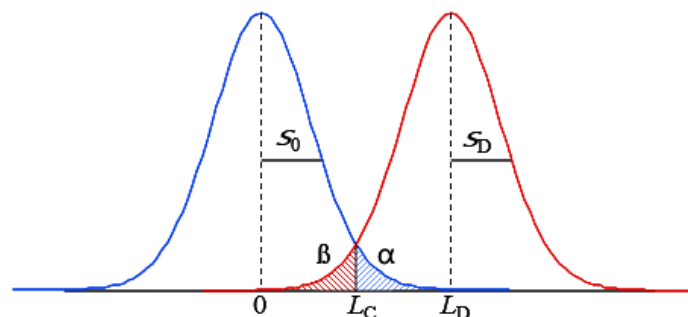


Figura 5 (Olivieri, 2002)

Siguiendo la recomendación de IUPAC de 1995, el límite de decisión es la concentración del analito para la que se comete un error “ $\alpha$ ” de 5% y el límite de detección es la concentración de analito para la que se comete un error  $\beta$  también del 5%.

A partir de una distribución normal, se encuentra que un nivel de significación  $\alpha=0.05$  corresponde a un valor  $z= 1.645$ ; así que para el límite de decisión, la distancia entre la señal y la media de las señales del blanco se encuentra a  $1.645s$ .

Por su parte para un error  $\beta=0.05$  se tiene una señal situada a una distancia  $1.645s$  por encima del límite de decisión; si se suman ambas distancias la señal en el límite de detección es:

$$LD = \bar{y}_{\text{blancos}} + (2 \times 1.645s_{\text{blancos}}) = \bar{y}_{\text{blancos}} + 3.29s_{\text{blancos}} \quad (67)$$

Dónde:

LD = Limite de detección

$\bar{y}_{\text{blancos}}$  = promedio de las lecturas de los blancos (diferentes de cero)

$s_{\text{blancos}}$  = desviación estándar de las lectura de los blancos.

Así que mientras el criterio  $3s$  establece el límite de detección a una distancia  $3s_b$  por encima de  $\bar{y}_b$ , el criterio  $\alpha=\beta=5\%$  lo establece a una distancia  $3.29s_b$ . La diferencia en la distancia es pequeña, sin embargo, lo que realmente importa es que en el criterio de  $\alpha=\beta=5\%$  la decisión de aceptar o rechazar la presencia del analito se toma a un valor de la señal más bajo (en el límite de decisión) que la correspondiente al límite de detección (Ramis et al., 2001).

**Criterio de aceptación:** Al igual que en el método anterior, la aceptación del valor obtenido dependerá de los límites prácticos del laboratorio en sus trabajos de rutina y de la verificación del valor por medio del método visual.

**2.2.5 Por la desviación estándar y pendiente de la respuesta:** Tomado como referencia la relación obtenida en el método anterior y haciendo un leve redondeo, el límite de detección (LD) puede ser expresado como:

$$LD = 3.3 \sigma \quad (68)$$

Cuando se busca la determinación de límites de detección, en métodos en los cuales es importante el establecimiento de la presencia o no del analito a muy bajas concentraciones, es recomendable realizar las lecturas de los blancos en señales de intensidad en vez de lecturas de concentración; ya que de esta forma se tendrá una mejor sensibilidad en los valores de lectura de los blancos.

El límite de detección a partir de la desviación estándar de los valores de intensidad no es fácil de interpretar, por ello se debe convertir el valor obtenido en señales de concentración multiplicando la expresión anterior por el valor de la pendiente de la curva de calibración.

$$LD = 3.3 \sigma \times S \quad (69)$$

Dónde:  $\sigma$  = es la desviación estándar de la respuesta en unidades de señal (intensidad)

$S$  = es la pendiente de la curva de calibración;

Al multiplicar la desviación de las unidades de intensidad por la pendiente de la curva de calibración se pasa de unidades de señal a unidades de concentración (Ramis et al., 2001).

La pendiente  $S$  puede ser estimada a partir de la curva de calibración del analito, mientras que el estimado de  $\sigma$  puede ser determinado en varias formas, por ejemplo:

- Basado en la desviación estándar de las mediciones de blancos.



- Basado en la curva de calibración: Se debe desarrollar una curva de calibración usando muestras que contengan el analito en un intervalo cercano al límite de detección estimado. Se comparan los valores obtenidos en cada punto con el valor “real” de la muestra; a partir de las diferencias entre los valores obtenidos y los valores reales se obtiene la desviación estándar de los residuales de la línea de regresión (valores reales menos valores obtenidos).
- O a partir de la desviación estándar de las intercepciones de “y” para un mismo punto en varias líneas de calibración.

### **2.3 Evaluación del límite de detección obtenido.**

**2.3.1** De forma general, para aquellos casos en donde se ha obtenido un valor estimado para el límite de detección por cálculo o extrapolación, el valor obtenido debiera ser validado por análisis independientes de muestras de concentración conocida cercana a los límites declarados (observación visual) (ICH Q2, 2005).

**2.3.2** El número de muestras a analizar depende de la complejidad del proceso de análisis y de los recursos del laboratorio. El laboratorio debe hacer referencia de cualquier documento que se tome como base para determinar la cantidad de muestras.

## 2.4 Ejemplos de aplicación:

Se utilizan los datos de la tabla 4 de ASTM D 6091-07(2014), obtenidos en un experimento interlaboratorial para determinar los límites de un método, se tienen 10 lecturas en unidades de intensidad para 4 diferentes concentraciones bajas partiendo de un blanco (concentración de cero).

Concentración	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>5</sub>	X <sub>6</sub>	X <sub>7</sub>	X <sub>8</sub>	X <sub>9</sub>	X <sub>10</sub>
0	1.41	3.94	2.22	3.48	1.96	0.92	2.17	2.36	4.5	3.26
0.25	4.1	3.51	4.07	4.34	4.54	2.76	2.03	4.13	6.06	6.47
0.5	3.97	7.34	6.41	6.25	6.38	7.64	4.67	6.74	4.38	6.48
1	7.54	7.68	8.38	7.14	3.12	10.97	11.15	10.44	9.73	7.27
2	8.2	13.97	12.88	18.31	16.47	16.06	12.56	14.21	13.96	17.37

Las estadísticas de estos datos a partir de las diez mediciones son:

Concentración	s	$\bar{x}$
0	1.1375	2.622
0.25	1.3349	4.201
0.5	1.2537	6.026
1	2.4052	8.342
2	2.9002	14.399

### a) Método: Relación ruido - señal:

La lectura de la concentración más pequeña utilizada se divide entre la lectura del cero para determinar la relación entre ellas.

Concentración	Lectura promedio	Relación
0	2.622	4.201/2.622=1.6022
0.25	4.201	

Una relación señal-ruido entre 3 o 2:1 es generalmente considerada aceptable para estimaciones del límite de detección, la relación obtenida es baja con respecto a este criterio, así que se usa la siguiente concentración.

Concentración	Lectura promedio	Relación
0	2.622	6.026/2.622=2.2982
0.50	6.026	

La relación obtenida en esta ocasión está dentro del criterio, así que el límite de detección estimado por este método es de  $y_{LOD} = 0.50$

b) Criterio “3σ” o “3s”, para un 99.87 % de nivel de confianza.

La fórmula a utilizar para este criterio es:

$$Y_{LOD} = Y_{blanco} + 3\sigma_{blanco}$$

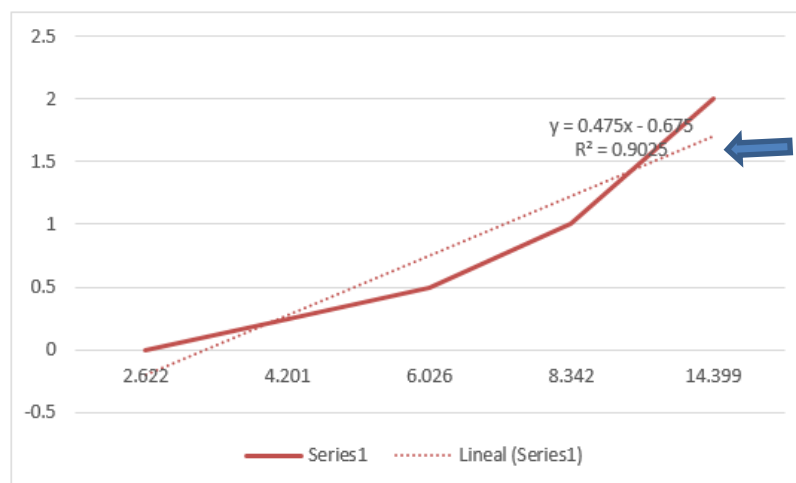
Se toman los datos del ejemplo anterior para la concentración cero.

Concentración	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>5</sub>	X <sub>6</sub>	X <sub>7</sub>	X <sub>8</sub>	X <sub>9</sub>	X <sub>10</sub>
0	1.41	3.94	2.22	3.48	1.96	0.92	2.17	2.36	4.5	3.26

Como se mencionó antes, las lecturas obtenidas están en unidades de intensidad, para aplicar la fórmula se necesitan resultados en unidades de concentración.

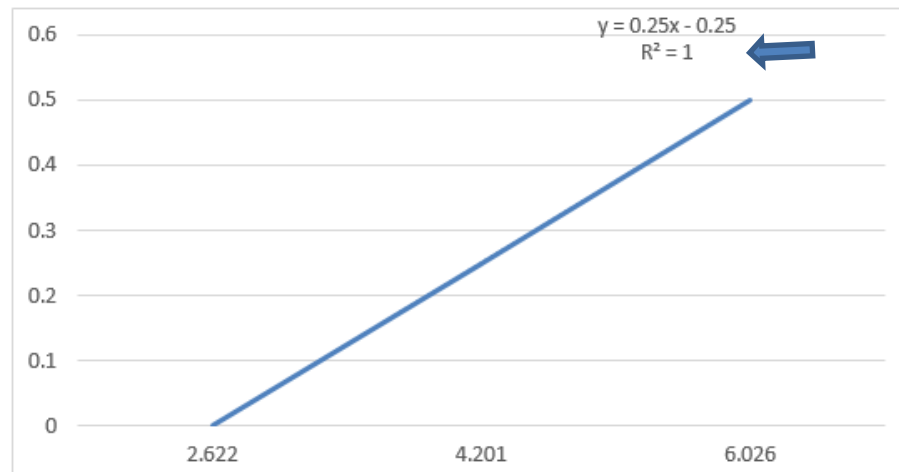
Se grafican las concentraciones de las soluciones contra las intensidades obtenidas a fin de obtener la función concentración-intensidad.

La gráfica resultante es la siguiente:



La relación no tiene un coeficiente de correlación muy adecuado (0.9025), lo que visualmente coincide con la falta de linealidad.

Buscando una relación más lineal se omiten las concentraciones de 1.5 y 2.



El coeficiente muestra una relación completamente lineal, por lo que se toma la ecuación resultante para convertir las lecturas de intensidad a concentración:

$$y = 0.25x - 0.25$$

Para el promedio de las diez lecturas del cero:

$$\bar{x} = 2.622$$

$$y = 0.25(2.622) - 0.25$$

$$y = 0.4055$$

Para la desviación estándar de las diez lecturas de cero:

$$s = 1.1375$$

$$s_y = 0.25(1.1375) - 0.25$$

$$s_y = 0.03438$$

El límite de detección calculado a con estos valores son es:

$$Y_{LOD} = Y_{\text{blanco}} + 3\sigma_{\text{blanco}}$$

$$Y_{LOD} = 0.4055 + 3(0.03438)$$

$$Y_{LOD} = 0.50863$$

**c) Criterio  $\alpha=\beta=5\%$ .**

Los cálculos son muy parecidos a la metodología de 3s; la fórmula a utilizar es:

$$y_{LOD} = \bar{y}_{\text{blancos}} + (2 \times 1.645s_{\text{blancos}}) = \bar{y}_{\text{blancos}} + 3.29s_{\text{blancos}}$$

El cálculo del límite de detección se realiza de la siguiente forma:

$$y_{LOD} = 0.4055 + 3.29 (0.03438)$$

$$y_{LOD} = 0.5186$$

**d) Por la desviación estándar y la pendiente de la respuesta.**

Otra forma de hacer la estimación del límite es utilizando directamente la desviación estándar de las lecturas en unidades de intensidad y multiplicando el resultado entre la pendiente de la curva de calibración.

Concentración	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>5</sub>	X <sub>6</sub>	X <sub>7</sub>	X <sub>8</sub>	X <sub>9</sub>	X <sub>10</sub>
0	1.41	3.94	2.22	3.48	1.96	0.92	2.17	2.36	4.5	3.26

$$s = 1.1375$$

$$\text{Ecuación de la recta: } y = 0.25x - 0.25$$

$$Y_{LOD} = (3\sigma_{\text{blanco}}) (\text{pendiente})$$

$$Y_{LOD} = (3) (1.1375)(0.25)$$

$$Y_{LOD} = 0.85315$$

Por este método se obtiene un límite de detección más conservador que en el método anterior.

El cálculo realizado en unidades de intensidad es considerado más sensible, por eso suele ser utilizado en análisis de residuales.

## 2.5 Conclusiones.

El límite de detección es un parámetro crítico para los laboratorios que requieren confirmar la presencia o no de un determinado analito; para estos casos es recomendable la determinación visual, ya que, cuando se hace bajo condiciones bien establecidas, se minimiza la posibilidad de cometer errores de presencia del elemento en cuestión. Es por ello que la técnica visual se utiliza para validar las otras herramientas de determinación del parámetro.

En los laboratorios que sólo requieren determinar este parámetro para mejor conocimiento de sus alcances, la determinación por medio de desviaciones estándar es muy utilizada (tal vez por ser la más referenciada); los ejercicios prácticos presentados nos muestran que no por simple es menos efectiva, ya que el valor obtenido utilizando esta herramienta es semejante a los obtenidos en las otras herramientas.

Igualmente el laboratorio debe hacer un balance de sus recursos y de que tan crítico es este parámetro en su proceso con el fin de elegir la mejor herramienta para sus propósitos.

### 3 LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN

#### 3.1 Definiciones

**3.1.1** El límite de cuantificación “LQ” es definido como la cantidad de analito arriba de la cual la desviación estándar relativa estimada (DER) es  $\leq 10\%$ . (IUPAC Orange Book.)

**3.1.2** El límite de cuantificación de un procedimiento analítico individual es la cantidad más baja de analito en una muestra que puede ser determinada cuantitativamente con una precisión y exactitud adecuada. (ICH Q2, 2005).

#### 3.2 Determinación del límite de cuantificación.

Se pueden definir varias metodologías para determinar el límite de cuantificación, estas suelen ser muy similares a las utilizadas para determinar el límite de detección; al igual que para el límite de detección, se debe considerar si el método es instrumental o no. Las estimaciones que se mencionan a continuación suelen ser de las aceptables.

**3.2.1 Por observación visual:** esta metodología puede utilizarse tanto para procesos instrumentales como no instrumentales, el límite de cuantificación es generalmente determinado por el análisis de muestras con concentraciones bajas conocidas del analito y estableciendo el mínimo nivel de concentración al cual puede ser cuantificado el analito con precisión y exactitud aceptables. Para ello se puede tomar como referencia la precisión obtenida para el método, siempre y cuando se haya verificado que la precisión no se ve afectada por la concentración del analito y que por lo tanto puede ser considerada como una precisión aceptable al límite de cuantificación esperado.

**Criterio de aceptación:** Al igual que en el límite de detección, esta metodología es una de las más utilizadas; se recomienda se realicen suficientes mediciones en la concentración determinada a fin de verificar que la precisión es la apropiada al laboratorio y por lo tanto se tenga la confianza de establecer en este punto el límite de cuantificación.

**3.2.2 Estimación basada en la señal de ruido:** Esta aproximación puede ser utilizada sólo en métodos analíticos que presentan una línea base de ruido. Al igual que para el límite de detección, la determinación de la relación señal-ruido es desarrollada comparando señales de medición de muestras con concentraciones bajas conocidas del analito con muestras de blancos, y estableciendo la mínima concentración a la cual el analito puede ser realmente cuantificable.

**Criterio de aceptación:** Una relación típica de señal-ruido para este propósito es de 10:1. (Taverniers et al., 2004)

**3.2.3 Por medio de la desviación estándar y la pendiente de la respuesta:** El límite de cuantificación (LQ), para lecturas en valores de intensidad (señal del equipo) puede ser expresado como:

$$LQ = 10 \sigma / S \quad (70)$$

Dónde:  $\sigma$  = es la desviación estándar de la respuesta en señal

S = Es la pendiente de la curva de calibración.

**3.2.4 A través de la desviación estándar de las mediciones de blancos:** se desarrolla analizando un número apropiado de muestras de blancos y calculando la desviación estándar de las respuestas.

$$LQ_y = \bar{y}_{blancos} + Ks_{blancos} \quad (71)$$



Dónde:

$\bar{y}$  = promedio de las mediciones de los blancos

s= desviación estándar de las lecturas de los blancos

K= Factor numérico de acuerdo al coeficiente de variación CV permitido o establecido por el laboratorio

Si K=10 el CV máximo permitido es de 10%

Si K=6 el CV máximo permitido es de 16,7%

Si K=5 el CV máximo permitido es de 20%.

La desviación estándar puede ser obtenida en la misma forma que se describe en el límite de detección (2.2.5)

**Criterio de aceptación:** si el límite de cuantificación es significativo en el método a validar se recomienda verificar el límite obtenido por medio del método visual.

**3.2.5 Por medio de la definición del intervalo de trabajo:** Normalmente el límite de cuantificación forma parte del estudio para determinar el intervalo de trabajo.

Este método se asemeja al método visual; aun cuando el límite inferior se determina no siempre a partir de la menor cantidad que es posible cuantificar, sino por la menor concentración, que en la práctica, suele analizarse o es posible verificar.

La forma en que se determina el límite de cuantificación, como punto inferior de la curva de calibración, puede ser:

- Con el límite inferior de la curva recomendado por la bibliografía.
- A través de la concentración más baja que le es posible preparar o conseguir al laboratorio con sus recursos, en estos casos el límite de detección no se determina por la imposibilidad de contar con muestras a concentraciones inferiores de la declarada como límite de cuantificación. Este caso es común cuando no es posible contar con materiales de referencia a concentraciones bajas

- De acuerdo al historial de trabajo del laboratorio se considera la menor concentración que suele analizarse en los trabajos de rutina y se evita la determinación de límites alejados del intervalo de trabajo.

Los límites de cuantificación no deben determinarse por extrapolación debajo de la concentración más baja establecida (Eurachem, 2014).

### 3.3 Evaluación del límite de cuantificación obtenido.

**3.3.1.** El límite de cuantificación y el método utilizado para determinar el límite deben ser documentados. El límite obtenido debe ser posteriormente validado por el análisis de un número apropiado de muestras de concentración conocida preparadas a una concentración cercana al valor de límite de cuantificación declarado, a menos que la determinación haya sido de esta forma (ICH Q2, 2005).

### 3.4 Ejemplos de aplicación:

a) Estimación basada en la señal de ruido

Tomando los mismos datos utilizados en el tema anterior para la determinación del límite de detección:

Concentración	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>5</sub>	X <sub>6</sub>	X <sub>7</sub>	X <sub>8</sub>	X <sub>9</sub>	X <sub>10</sub>
0	1.41	3.94	2.22	3.48	1.96	0.92	2.17	2.36	4.5	3.26

$$\bar{x} = 2.622$$

$$s = 1.1375$$

En el caso del límite de cuantificación una relación típica de señal-ruido es de 10:1.

En la determinación del límite de detección se observó que la relación de la concentración de cero con la concentración de 0.5 es de 2.29; así que se iniciara con la relación correspondiente a la siguiente concentración.

Concentración	Lectura promedio	Relación
0	2.622	8.342/2.622=3.1815
1.0	8.342	

La relación es baja, se continúa con la otra concentración.

Concentración	Lectura promedio	Relación
0	2.622	14.399/2.622=5.4916
2.0	14.339	

La relación obtenida con la última concentración disponible es aun baja con respecto al criterio 10:1; como ya no se tienen más concentraciones no es posible determinar el límite de cuantificación por este medio.

Sin embargo podemos hacer una estimación: si para la concentración de 2.0 la relación es de 5.49; el límite de cuantificación podría estar cercano a la concentración de 4.

b) A través de la desviación estándar de las mediciones de blancos

Tomado los valores utilizados en la determinación del límite de detección:

Concentración	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>5</sub>	X <sub>6</sub>	X <sub>7</sub>	X <sub>8</sub>	X <sub>9</sub>	X <sub>10</sub>
0	1.41	3.94	2.22	3.48	1.96	0.92	2.17	2.36	4.5	3.26

$$\bar{x} = 2.622$$

$$s = 1.1375$$

$$\text{Ecuación de la recta: } y = 0.25x - 0.25$$

Se determina el resultado de la desviación estándar en valores de concentración con la ecuación obtenida en el ejemplo para el límite de detección.

- Para la lectura promedio de las diez lecturas del cero:

$$y = 0.25 (2.622) - 0.25$$

$$y = 0.4055$$

- Para la desviación estándar de las diez lecturas de cero:

$$s = (0.25)(1.1375) - 0.25$$

$$s = 0.03438$$

- Se utiliza la fórmula para la determinación del límite de cuantificación:

$$LQ_y = \bar{y}_{blancos} + Ks_{blancos}$$

- Se sustituyen los valores de K recomendados:

Para K = 5

$$LQ_y = 0.4055 + (5)(0.03438) = 0.5774$$

Para K = 6

$$LQ_y = 0.4055 + (6)(0.03438) = 0.6118$$

- Y finalmente, para K = 10:

$$LQ_y = 0.4055 + (10)(0.03438) = 0.7493$$

c) Por medio de la desviación estándar y la pendiente de la respuesta

Tomando los datos anteriores, se trabaja primero con los resultados en unidades de intensidad y posteriormente se multiplica por el valor de la pendiente para obtener el límite de cuantificación en unidades de concentración.

$$s = 1.1375$$

$$\text{Ecuación de la recta: } y = 0.25x - 0.25$$

$$Y_{LOD} = (3\sigma_{blanco}) (\text{pendiente})$$

$$Y_{LOD} = (10) (1.1375)(0.25)$$

$$Y_{LOD} = 2.84382$$

d) Por medio de la definición del intervalo de trabajo:

Una de las formas más prácticas de determinar el límite de cuantificación es estableciendo éste como el punto más bajo de la curva de calibración determinada en el establecimiento del intervalo de calibración: Para ello se puede trabajar con las metodologías mencionadas en el inciso 1.2 de este capítulo.

### **3.5 Conclusiones:**

Contrario a lo obtenido en las diferentes metodologías de la determinación del límite de detección, el límite de cuantificación obtenido es visiblemente diferente con cada una de las herramientas. Esto no significa que las herramientas no sean confiables, más bien implica que el laboratorio debe hacer una validación visual de cualquiera de los métodos utilizados como se menciona en 3.3.

La importancia del límite de cuantificación es incuestionable en todos los métodos, es por ello que el laboratorio debe establecer muy bien sus condiciones y requerimientos de manera que el límite de cuantificación determinado sea lo más cercano posible a la realidad.

El laboratorio puede establecer el límite inferior de su intervalo de trabajo como límite de cuantificación, sí se lo permite el uso propuesto del método analítico; aun así es muy recomendable hacer la determinación por observación visual; esto es, mediante análisis de varias muestras a concentraciones bajas hasta encontrar aquella concentración en donde se obtenga un nivel de precisión aceptable.

### TEMA III

## **PARÁMETROS PARA DEFINIR LAS CONDICIONES DE MEDICIÓN: ESTABLECIMIENTO O COMPROBACIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS DE APLICACIÓN DEL MÉTODO DE PRUEBA.**

### **Introducción al tema.**

Cuando un laboratorio de prueba utiliza un método normalizado, esto es, un método emitido por un organismo reconocido regional o internacional y, procura seguir las condiciones establecidas; ya que le asegura obtener resultados dentro de un cierto nivel de precisión determinado previamente. Condiciones como: concentraciones, niveles de pH, temperaturas, intervalos de medición, parámetros de los equipos, etc.; suelen estar definidos dentro de la metodología.

Estas condiciones generalmente se establecen por medio de estudios interlaboratorio; Un grupo de laboratorios realizan análisis de especímenes de prueba provenientes de la misma muestra, intercambiando las variables señaladas de mayor influencia, hasta encontrar aquellas condiciones en donde el resultado muestra la mejor exactitud (veracidad y precisión). Con estas condiciones, los organismos emiten la metodología normalizada de los métodos de prueba.

Es común que un laboratorio requiera adaptar una metodología a sus recursos y aplicaciones; el problema se presenta cuando esta adaptación va más allá de una “Desviación al método”, en otros casos los laboratorios utilizan metodologías analíticas no normalizadas: métodos desarrollados internamente, métodos de revistas, etc.

Es en estas circunstancias cuando el laboratorio tiene la necesidad de realizar un estudio del método analítico para establecer las condiciones en las cuales deberá desarrollarse la prueba para obtener los resultados esperados.

Este estudio deberá comprender la determinación de la robustez, la sensibilidad y la selectividad del método analítico.

## **1.0 ROBUSTEZ**

### **1.1 Definiciones**

**1.1.1** ‘La robustez de un procedimiento analítico es una medida de su capacidad de permanecer inalterado por variaciones pequeñas pero deliberadas en los parámetros del método. Proporciona una indicación de su confiabilidad durante su uso normal.’ [ICH Q2A, CPMP/ICH/381/95] (Eurachem, 2014)

**1.1.2** La robustez de un método analítico es la resistencia al cambio en los resultados producidos por un método analítico cuando son hechas desviaciones menores a partir de las condiciones experimentales descritas en el procedimiento (IUPAC, 2002).

### **1.2 Evaluación de la robustez.**

Dado que las condiciones en las cuales se desarrolla un método analítico no son siempre las mismas en las que se llevó a cabo la validación original, el laboratorio debería analizar aquellas adecuaciones en: equipo, parámetros, reactivos, concentraciones, condiciones ambientales, etc.; con el fin de mantener evidencia de la no afectación de los resultados esperados o, en caso de ser requerido, tomar acciones para minimizar el efecto de los factores que afectan. La identificación de estos factores también puede utilizarse para introducir mejoras al método; las cuales se esperarían fueran más significativas sobre las variables críticas.

La forma en que se evalúa la afectación de las variantes al método es mediante “pruebas de robustez”, éstas se realizan induciendo modificaciones deliberadas en los factores o variables que tienen el efecto más significativo. Los experimentos son diseñados de manera que, deliberada y sistemáticamente, se introducen cambios conocidos en los parámetros; los cambios introducidos deben reflejar la variación que puede ocurrir durante la operación normal del método (Hopkins et al., 2008).

Las pruebas pueden realizarse considerando:

- Los efectos por separado de cada factor,
- Variando cada parámetro en particular en pequeñas cantidades (por ejemplo 10%) después de cada medición y controlando las otras condiciones apropiadamente.
- Tomado valores en los extremos de uso (alto y bajo)
- Tomado el valor normal de uso y uno alterno o sugerido.

De forma general, las pruebas de robustez se aplican normalmente para investigar su efecto sobre los valores de precisión (dispersión) y sobre la veracidad del método. (Eurachem, 2014)

### **1.2.1 Experimentos de robustez con variaciones sencillas: efecto individual de cada factor.**

En los experimentos de robustez con variaciones sencillas o simples, se hacen las modificaciones en una sola variable por prueba y con solo una modificación por variable.

Como se menciona en 1.2; esta variación puede ser un valor alto con uno bajo, un valor normal con uno alternativo, etc.

Básicamente el experimento consiste en realizar el ensayo en las condiciones normales y posteriormente repetirlo haciendo la modificación deseada en una sola de las variables consideradas como significativas, es importante mantener estable el resto de las variables, pues de otra forma podrían influir en el resultado y no sería visible el cambio debido a la condición de la variable de interés.

A fin de obtener una mejor representación del comportamiento de la variable, es muy recomendable hacer al menos 2 réplicas de cada experimento, de forma que la comparación se realice con los promedios obtenidos.



### 1.2.1.1 Evaluación de los resultados obtenidos en experimentos de variaciones sencillas.

La robustez puede ser evaluada en tres formas principalmente:

- i. **En términos de dispersión:** Prueba F; se evalúan las desviaciones en la condición inicial y bajo condiciones experimentales sobre la precisión de la medición

Hipótesis nula  $H_0: s_{total} = s_A$

Hipótesis alterna:  $H_0': s_R = 0$

$$\widehat{F} = \frac{s_{Total}^2}{s_A^2} = \frac{s_A^2 + s_B^2}{s_A^2}$$

Dónde:

$s_A$  = desviación debida al analito (error experimental)

$s_B$  = desviación debida a los factores de influencia e interferencias conocida.

$\widehat{F}$  = F calculada

#### **Criterio de aceptación:**

Si  $\widehat{F} \leq F(\alpha, \nu_1, \nu_2)$  la hipótesis nula no puede ser rechazada y el proceso puede ser considerado robusto.

- ii. **En términos del valor medio:** por medio de una prueba t

Hipótesis nula  $H_0: Y_A = Y_B$  ; el valor promedio del método original es igual al valor promedio del método modificado

Hipótesis alterna:  $Y_A \neq Y_B$  ; el valor promedio del método original es igual al valor Promedio del método modificado

De acuerdo a lo descrito en el capítulo I párrafo 2.3.1.6 (comparación de media del método de referencia con la media de un método propuesto):

- **Para varianzas estadísticamente iguales:**

$$t_{calculada} = \frac{|\bar{y}_A - \bar{y}_B|}{\sqrt{\frac{s_B^2(n_B - 1) + s_A^2(n_A - 1)}{n_B + n_A - 2} \left| \frac{1}{n_B} + \frac{1}{n_A} \right|}}$$

- **Para varianzas estadísticamente diferentes:**

$$t_{calculada} = \frac{|\bar{y}_A - \bar{y}_B|}{\sqrt{\frac{s_B^2}{n_B} + \frac{s_A^2}{n_A}}}$$

Comparar la  $t_{calculada}$  con la  $t_{tablas}$  en una tabla t de dos lados, para un nivel de significancia  $\alpha=0.05$  y los grados de libertad  $v_{eff}$ , obtenidos con la aproximación de Welch-Satterthwaite (Satterthwaite, 1941).

$$v_{eff} = \frac{\left| \frac{s_A^2}{n_A} + \frac{s_B^2}{n_B} \right|^2}{\frac{s_A^4}{n_A - 1} + \frac{s_B^4}{n_B - 1}}$$

### **Criterio de aceptación:**

- Si  $t_{calculada} \leq t_{tablas}$ ; no hay evidencia de que el valor medio obtenido por el método original sea diferente del obtenido con el método alterno. El proceso se considera robusto.
- Si por otro lado  $t_{calculada} > t_{tablas}$ , se concluye que el valor promedio obtenido por el método original es estadísticamente diferente del obtenido con el método alterno. La robustez del método puede estarse perdiendo.

**iii. En términos de cambios en la pendiente:** usando la t de Students.

Para realizar esta comparación es necesario analizar varios puntos en la curva, tanto en el método de referencia (u original) y el método alternativo (con cambios en la variable). Esto restringe esta metodología a métodos en donde se utilicen curvas de calibración o en donde se puedan obtener curvas de respuesta. Se sugiere utilizar los mismos puntos en ambos métodos para que la comparación sea más clara

Hipótesis nula Ho:  $b = \beta_0$

Hipótesis Alternativa:  $b \neq \beta_0$

$$t_{calculada} = \frac{b - \beta_0}{s / \sqrt{S_{xx}}} \quad (72)$$

Dónde:

b = Pendiente resultado de las lecturas con el método alterno

$\beta_0$  = Pendiente con el método original

s = Desviación estándar de las lecturas del método de referencia

$S_{xx}$  = Sumatoria de desviaciones

$$S_{xx} = \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \quad (73)$$

**Criterio de aceptación:**

Se compara la t calculada con  $t_{\alpha, \nu}$  = t de tablas para un nivel  $\alpha$  y  $\nu$  grados de libertad; si t calculada es menor que t de tablas se acepta la hipótesis nula; no hay diferencia entre la pendiente del método original y la pendiente del método alterno (con variación).

- Si t calculada es mayor que t crítica de tablas no hay evidencia de que la hipótesis nula sea verdadera, se acepta la hipótesis alterna. La variación realizada en el método si influyó en la pendiente de la muestra.

### 1.2.2 Experimentos de robustez con variaciones múltiples

Cuando se tienen identificadas varias variables que pueden ser significativas, realizar experimentos sencillos puede llevar mucho tiempo. Para ello es necesario utilizar herramientas estadísticas que permitan al laboratorio realizar varios experimentos simultáneamente considerando estas variables para obtener conclusiones acerca de la robustez del método.

#### 1.2.2.1 Comparación de medias por medio de Anova:

El Anova es equivalente a la t de Students para la comparación entre más de dos medias. El objetivo principal de Anova es contrastar si existen diferencias cuando se tienen más de dos grupos de mediciones.

La herramienta Anova se describió en el capítulo I en el punto 1.2.3 para el cálculo de los parámetros de precisión, en donde los tratamientos correspondían a las diferentes condiciones que podían darse para el método de prueba en la rutina del laboratorio; en este caso, cada uno de los tratamientos corresponde a un cambio en una variable.

Retomado el arreglo de datos para el análisis de varianzas (anova) de la tabla 2

Tratamiento	Observaciones (resultados)						Promedio
1	$y_{11}$	$y_{12}$	$y_{13}$	...	...	$y_{1n}$	$\bar{y}_1$
2	$y_{21}$	$y_{22}$	$y_{23}$	...	...	$y_{2n}$	$\bar{y}_2$
3	$y_{31}$	$y_{32}$	$y_{33}$	...	...	$y_{3n}$	$\bar{y}_3$
...	...	...	...	...	...	...	...
p	$y_{p1}$	$y_{p2}$	$y_{p3}$	...	...	$y_{pn}$	$\bar{y}_p$

A fin de contar con un criterio de aceptación, se requiere el estadístico F dentro de los cálculos de anova.

Fuente de variación	Grados de libertad	Sumas de Cuadrados	Cuadrados medios o medias cuadráticas
Tratamiento	<b>p-1</b>	$SS_{tratamiento} = \sum_{i=1}^h n_i (\hat{y}_i - \bar{y})^2$	$CM_{tratamiento} = \frac{SC_{tratamiento}}{p-1}$
Error	<b>n-1</b>	$SS_{error} = SS_{total} - SS_{tratamiento}$	$CM_{error} = \frac{SC_{error}}{n-1}$
Total	<b>N-1</b>	$SC_{total} = \sum_i \sum_j^n (y_{ij} - \bar{y})^2$	$CM_{total} = \frac{SC_{total}}{N-1}$

Tabla 6 (Walpore, et al, 2007)

### 1.2.2.2 Evaluación de los resultados obtenidos por medio de anova.

Los cálculos de anova requieren cierto grado de trabajo si se realizan manualmente, por ello es recomendable el uso de las herramientas estadísticas que suelen formar parte de los programas para hojas de cálculo más utilizados.

En la mayoría de los programas de cálculo la tabla anova presenta la F de Fisher como estadístico de aprobación; y en algunos paquetes estadísticos incluye el valor p. Ambos pueden ser usados como estadísticos de aprobación.

La hipótesis nula a probar es Ho: no hay diferencia entre las medias de los tratamientos, la hipótesis alterna es Hi: hay diferencia entre las medias de los tratamientos.

#### Criterio de aceptación:

- a) Estadístico F: Para contrastar si las medias son estadísticamente iguales se usa el estadístico F de una cola. Se consideran dos posibilidades:
  - $F_o < F_{\alpha,p-1,n-1}$ ; No rechaza hipótesis nula Ho. Si F calculada es menor que F crítica, se pueden considerar las variables estadísticamente iguales, así que el método es robusto contra los cambios realizados en las variables (tratamientos).

- $F_o > F_{\alpha, p-1, n-1}$ ; Rechaza hipótesis nula  $H_o$ , se acepta hipótesis alterna  $H_i$ . Si  $F$  calculada es mayor que  $F$  crítica entonces se puede deducir que existen diferencias entre las medias presentes. El método no es robusto para alguna de las variables usadas.

Dónde:

$F_o = F$  calculada, o  $F$  obtenida del cálculo de anova

$F_{\alpha, p-1, n-1} = F$  de tablas o  $F$  crítica para un nivel de confianza  $\alpha$  y grados de libertad  $p-1$  y  $n-1$ .

- b) Estadístico  $p$ :** El estadístico  $p$  nos representa la fracción con respecto al área contenida en una distribución normal en donde es probable que se encuentren los valores medios. Cuando se establece un nivel de confianza,  $\alpha$  corresponde al máximo error aceptable; visualizando una gráfica de comportamiento normal, aquellos valores por debajo del valor de  $\alpha$  se consideran en una zona por fuera del nivel de confianza establecido.

El estadístico  $p$  indica si los valores de los promedios tienen la probabilidad de encontrarse dentro de la zona de aceptación (mayor que  $\alpha$ ); o en la zona de rechazo (menor que  $\alpha$ ); las posibilidades son dos:

- $p \geq \alpha$ , se acepta  $H_o$ . Si  $p$  es mayor que  $\alpha$  entonces se pueden considerar las medias estadísticamente iguales, así que el método es robusto contra los cambios realizados en las variables (tratamientos)
- $p < \alpha$ , entonces se rechazar  $H_o$ , y se aceptar  $H_i$ . Si  $p$  es menor que  $\alpha$ , significa que existen diferencias entre las medias presentes. El método no es robusto para alguna de las variables

### 1.2.2.3 Identificación de variables significativas.

Cuando se rechaza  $H_o$ , hay evidencia de que la medias no son iguales o al menos una no es igual, pero no se sabe cuál (o cuales) de ellas son estadísticamente diferente. Para identificar la (s) media (s) con variación significativa se sigue el siguiente proceso:

- Se colocan las medias en orden creciente; o bien se colocan de forma que la referencia siempre sea el método de prueba original.
- Se comparan entre ellas utilizando cualquiera de los siguientes criterios:

**a) Pruebas visuales o representaciones gráficas:**

- Diagrama dispersión: es una forma sencilla de visualizar la semejanza entre los datos obtenidos para cada uno de los tratamientos. Se puede realizar en forma manual o bajo algún programa estadístico; esta herramienta da una buena aproximación de la igualdad o no de las medias a comparar. Se busca identificar valores superpuestos en las diferentes medias considerando sus valores de dispersión.
- Esta es una opción un poco más elaborada, para ello se requiere transformar los promedios obtenidos en cada tratamiento en valores  $t$  dentro de una distribución normal. Considerando esta secuencia, es algo semejante a hacer una comparación con  $t$  de Students: Asumiendo que cualquier valor  $\bar{x}_i$  se distribuye con una distribución normal, alrededor de una media  $\mu$  con una desviación estándar  $\sigma/\sqrt{n}$ ; se representa cada uno de los valores  $t$  correspondientes a las medias calculadas.

**b) Prueba de la Diferencia Mínima Significativa (LSD o DSM) Método Fisher**

Este es uno de las pruebas más utilizadas y referenciadas; se comparan las diferencias entre valores adyacentes con una cantidad llamada “la mínima diferencia significativa” o Diferencia Significativa Mínima (*DSM*), la cual se define como la diferencia mínima que podría existir entre dos medias de muestras significativamente diferentes y viene dada por:

$$DSM = \left| \bar{X}_i - \bar{X}_j \right| = t_{\alpha/2} \sqrt{\frac{2s^2}{n}} \quad (74)$$

Dónde:

$s$  = variación dentro de muestras

$n$  = es el número de mediciones realizadas.

$t$  : es el valor de  $t$  Student para un nivel  $\alpha/2$  y  $n-1$  grados de libertad

Si no se tiene el mismo número de mediciones entre las medias a evaluar, se utiliza la siguiente fórmula:

$$DSM = |\bar{X}_i - \bar{X}_j| = t_{\alpha/2} \sqrt{2s^2 \left( \frac{1}{n_i} + \frac{1}{n_j} \right)} \quad (75)$$

**Criterio de decisión:** Cada diferencia de las medias que sea mayor que el valor de DSM calculado, se declara significativa.

$$|\bar{X}_i - \bar{X}_j| > DSM ; \text{ Se rechaza } H_0$$

**c) Prueba de Tukey.**

Se utiliza la prueba Tukey cuando al menos una de las medias estudiadas es diferente. Se basa en la construcción de intervalos de confianza de las diferencias por pares. Si estos intervalos incluyen al 0, entonces no se rechaza la hipótesis nula (método de rechazo por intervalos de confianza).

La prueba Tukey declara que dos medias son significativamente diferentes si el valor absoluto de sus diferencias muestrales excede el valor  $T_\alpha$ .

$$|\bar{Y}_i - \bar{Y}_j| > T_\alpha \quad ; T_\alpha = q_\alpha(a, f) \sqrt{\frac{MS_E}{n}} \quad (76)$$

Dónde:

$q_\alpha(a, f)$  = es el punto porcentual superior de  $\alpha$  de  $q$ ,

$a$  = es el número de tratamientos, y

$f$  = es el número de grados de libertad para el error.

Si ni se tiene el mismo número de mediciones en las medias a comparar se utiliza la siguiente fórmula para construir intervalos de confianza para todos los pares de medias:



$$T\alpha = q_\alpha(a, f) \sqrt{MS_E \left( \frac{1}{n_i} + \frac{1}{n_j} \right)} \quad (77)$$

**Criterios de decisión:**

- Si “0 cero” cae dentro del intervalo de confianza alrededor de la diferencia de las dos medias, entonces no pueden obtenerse conclusiones (No rechazar Ho), y el método se puede considerar robusto para el tratamiento.
- Si “0 cero” cae fuera del intervalo de confianza alrededor de la diferencia de las dos medias, entonces existe una diferencia (Rechazar Ho, Aceptar Ha), el método no es robusto para el tratamiento utilizado.

**d) Prueba de Dunnett:**

Esta prueba es especialmente usada cuando el laboratorio está interesado en determinar qué tratamiento es diferente de un testigo, control o tratamiento estándar, y no en hacer todas las comparaciones posibles, es decir, cuando se quiere comparar el testigo con cada uno de los tratamientos en estudio. Este procedimiento de prueba determina diferencias significativas entre cada media del tratamiento y el control, con un solo nivel conjunto de significancia,  $\alpha$ .

Para ello se aplican las siguientes ecuaciones:

$$d_i = \frac{\bar{y}_i - \bar{y}_0}{\sqrt{\frac{2s^2}{n}}} \quad (78)$$

Dónde:

$\bar{y}_i$  = promedio de las mediciones realizadas en la muestra con variable

$i = 1, 2, \dots, k$  tratamientos utilizados (sin incluir el control)

$\bar{y}_0$  = Promedio de muestra control o estándar.

$s^2$  = se obtiene del error cuadrático medio del análisis de varianza.

**Criterio de decisión:**

La región crítica para rechazar Ho con el nivel de significancia  $\alpha$  se establece de la siguiente relación:

$$|d_i| > d_{\alpha/2}(k, v)$$

Dónde:

$v$  = número de grados de libertad para el error cuadrático medio

$d_{\alpha/2}(k, v)$  = valores para una prueba de dos colas obtenido de tablas para un nivel  $\alpha$ , y diversos valores de  $k$  (tratamientos) y  $v$  (grados de libertad)

#### 1.2.2.4 Diseño de experimentos de robustez utilizando Diseño de experimentos

El diseño simple mencionado en el 1.2.2.1 sólo permite verificar el efecto de la variación en un solo punto; es posible hacer un estudio en más detalle para cada variable por medio de experimentos multifactoriales, o diseño de experimentos, donde cada factor es usualmente variado en dos niveles: el normal y el alterado, bajo y alto, etc.

Los diseños de experimentos se denominan con un número que identifica los niveles usados (dos en este caso) y un subíndice que indica el número de variables utilizadas.

Se describen a continuación diseños de experimentos para diferentes números de variables:

- Un diseño de experimento considerando dos factores en dos diferentes niveles es un arreglo  $2^2$ , en donde se requieren 4 experimentos u 8 si se hacen dos réplicas por experimento:

Factores	Niveles		Experimento	A	B	Resultado
A	Bajo (-)	Alto (+)	1	-	-	$Y_1$
B	Bajo (-)	Alto (+)	2	+	-	$Y_2$
	(a)		3	-	+	$Y_3$
			4	+	+	$Y_4$

(b)

Tablas 7 (a y b)

•

- Una combinación de tres factores en dos niveles corresponde a un diseño factorial  $2^3$ , cuyo arreglo sería el siguiente:

Factores		Niveles		Experimento	A	B	C	Resultado
				1	-	-	-	$Y_1$
A	Bajo (-)	Alto (+)		2	+	-	-	$Y_2$
B	Bajo (-)	Alto (+)		3	-	+	-	$Y_3$
C	Bajo (-)	Alto (+)		4	+	+	-	$Y_4$
				5	-	-	+	$Y_5$
				6	+	-	+	$Y_6$
				7	-	+	+	$Y_7$
				8	+	+	+	$Y_8$

(a)

(b)

Tablas 8 (a y b)

Son necesarias ocho mediciones para utilizar las diferentes combinaciones; se debe considerar que a fin de obtener mejor información es muy recomendable hacer al menos 2 réplicas de cada combinación, lo que resulta en al menos 16 mediciones independientes.

- En un diseño de experimentos para cuatro factores el número de experimentos se incrementa considerablemente:

Factores	Niveles	
A	Bajo (-)	Alto (+)
B	Bajo (-)	Alto (+)
C	Bajo (-)	Alto (+)
D	Bajo (-)	Alto (+)

(a)

Experimento	A	B	C	D	Resultado
1	-	-	-	-	Y <sub>1</sub>
2	+	-	-	-	Y <sub>2</sub>
3	-	+	-	-	Y <sub>3</sub>
4	+	+	-	-	Y <sub>4</sub>
5	-	-	+	-	Y <sub>5</sub>
6	+	-	+	-	Y <sub>6</sub>
7	-	+	+	-	Y <sub>7</sub>
8	+	+	+	-	Y <sub>8</sub>
9	-	-	-	+	Y <sub>9</sub>
10	+	-	-	+	Y <sub>10</sub>
11	-	+	-	+	Y <sub>11</sub>
12	+	+	-	+	Y <sub>12</sub>
13	-	-	+	+	Y <sub>13</sub>
14	+	-	+	+	Y <sub>14</sub>
15	-	+	+	+	Y <sub>15</sub>
16	+	+	+	+	Y <sub>16</sub>

(b)

Tablas 9 (a, b)

Los estadísticos más utilizados para establecer los criterios de rechazo son la F de Fisher y el valor p (valor de probabilidad); a continuación se muestra un ejemplo del cálculo de ambos estadísticos para un diseño de experimentos 2<sup>2</sup>.

Variable	SC	GL	CM	F0	Valor p
A	SCA	a-1	CMA	CMA/CME	P(F>F <sub>0</sub> <sup>A</sup> )
B	SCB	b-1	CMB	CMB/CME	P(F>F <sub>0</sub> <sup>B</sup> )
AB	SCAB	(a-1)(b-1)	CMAB	CMAB/CME	P(F>F <sub>0</sub> <sup>AB</sup> )
Error	SCE	ab(n-1)	CME		
Total	SCT	abn-1			

Tabla 10

Dónde:

$$SCA = [1/4n] [ab + a - b - (1)]$$

$$SCB = [1/4n] [ab + b - a - (1)]$$

$$SCAB = [1/4n] [ab + 1 - a - b]$$

$$SCE = SCT - SCA - SCB - SCAB$$

Experimento	A	B	Resultado
1	-	-	1
2	+	-	a
3	-	+	b
4	+	+	ab

La determinación del valor  $p$  es un poco más complicada y no se tratará en este trabajo. En programas estadísticos como Minitab la hoja de resultados incluye los dos estadísticos de aceptación, Excel solo incluye la  $F$ .

### **Criterio de aceptación:**

- Si  $F_{calculada} > F_{critica}$  se rechaza  $H_0$ , lo que indica que la media obtenida para esa variable es diferente del resto.
- Por el contrario si  $F_{calculada} < F_{critica}$  no hay evidencia de que existan diferencias entre las medias de los diferentes tratamientos.
- Si el valor  $p < \alpha$ , indica que la media está fuera del intervalo de confianza establecido.
- Si el valor  $p > \alpha$ , el resultado obtenido del tratamiento está dentro del intervalo de confianza definido, no hay indicaciones de que el resultado sea diferente en los tratamientos.

Si la hipótesis nula se rechaza es recomendable hacer un análisis de las diferentes medias utilizando cualquiera de las herramientas mencionadas en la sección anterior. Otra forma de establecer criterios de aceptación es considerar los factores de cada una de las variables como se describe más adelante para el diseño de experimentos

### **Diseño de experimentos para más de cuatro variables significativas.**

No es común que en un laboratorio de pruebas se consideren más de cuatro variables significativas; pero de ser éste el caso, el número de experimentos a realizar se incrementa con respecto a los anteriores ejemplos; para cinco variables el número de mediciones es de 32, si estas se hacen por duplicado serían 64 mediciones que realizar.

Un experimento económico que solo requiere hacer 8 mediciones, basado en un diseño factorial fraccionado, ha sido descrito por Youden (IUPAC, 2002).

Los pasos a seguir para el diseño son:

1. Identifica los factores de influencia
2. Para cada factor, definir el valor nominal y valores extremos esperados: valor nominal=0, valor máximo=+1 y valor mínimo=-1.
3. Organizar un diseño de experimentos usando un nivel  $2^{7-4}$ ; por medio del arreglo fraccionado sugerido por Plackett-Burman;
4. Llevar a cabo los diferentes experimentos en orden al azar con una muestra cuya concentración del analito este a la mitad del intervalo del alcance del método.

Plackett-Burman proponen un estudio en el cual pueden ser estudiados hasta siete parámetros al mismo tiempo usando ocho experimentos separados. Cada parámetro es estudiado en dos posibles valores: uno “normal” y otro “alternativo”. Pueden usarse menos parámetros pero se deben mantener los ocho experimentos para mantener el balance del experimento.

#### Experimento de Plackett-Burman

Experimento	Parámetros del método							Resultados
1	A	B	C	D	E	F	G	s
2	A	B	c	D	e	f	g	t
3	A	b	C	d	E	f	g	u
4	A	b	c	d	e	F	G	v
5	a	B	C	d	e	F	g	w
6	a	B	c	d	E	f	G	x
7	a	b	C	D	e	f	G	y
8	a	b	c	D	E	F	g	z

Tabla 11 (LGC, 2003)

A continuación se muestra el arreglo para una cantidad menor de variables

- Para cuatro factores se usan las columnas A, B, C y E;
- para cinco factores se usan las columnas A, B, C, D y F
- Para seis factores se usa A, B, C, D, F y G

Experimento	A	B	C	D	E	F	G	Resultados
1	1	1	1	-1	1	-1	-1	X <sub>1</sub>
2	-1	1	1	1	-1	1	-1	X <sub>2</sub>
3	-1	-1	1	1	1	-1	1	X <sub>3</sub>
4	1	-1	-1	1	1	1	-1	X <sub>4</sub>
5	-1	1	-1	-1	1	1	1	X <sub>5</sub>
6	1	-1	1	-1	-1	1	1	X <sub>6</sub>
7	1	1	-1	1	-1	-1	1	X <sub>7</sub>
8	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	X <sub>8</sub>

Tabla 12

### 1.2.2.5 Evaluación de los resultados obtenidos:

- Para cada parámetro del método se calcula la diferencia entre el promedio de los resultados con los parámetros en su valor normal (A, B, C, D, F, G) y el promedio de los parámetros obtenidos con los parámetros en su valor alternativo (a, b, c, d, f, g). Por ejemplo para el parámetro “B”

$$D_B = \frac{s + t + w + x}{4} - \frac{u + v + y + z}{4} \quad (79)$$

- Ordene los valores absolutos de las diferencias en forma ascendente.

Nota: Como forma de evaluación visual se puede hacer con un gráfico de efectos (considerando los signos) o un gráfico de efectos estandarizados de Pareto (en valores absolutos).

Nota: Esta herramienta no contempla la interacción entre factores, por tanto es útil sólo si se establece que no hay interacción de los factores (AB, BC, AC, ABC, etc.)

**Criterios de decisión:**

- Cualquier diferencia que sea mayor de la raíz de dos por la desviación estándar de las réplicas de las mediciones, bajo condiciones normales, es estadísticamente significativa a un nivel de confianza del 95%.

$$\bar{y}_i - \bar{y}_0 > s\sqrt{2}$$

- Algunos autores presentan como criterio de aceptación 2 veces la desviación estándar; con lo cual la relación sería la siguiente

$$\bar{y}_i - \bar{y}_0 > 2s$$

- Otra forma de obtener conclusiones sobre el efecto de las variables es observando el valor obtenido en la resta, esto es el efecto sobre la variable de respuesta.
  - Positivo: aumenta la respuesta
  - Negativo: disminuye (tiene un efecto reductor) sobre la respuesta
  - Valores pequeños: si se utilizó un material de referencia la resta debe ser menor que la incertidumbre o desviación estándar declarada: de ser así no es significativo el efecto.
- Determinación de las variables significativas usando prueba t: Una vez que se ha determinado el efecto de cada variable ( $D_i$ ); se utiliza la siguiente fórmula:

$$t_i = \frac{\sqrt{2} * |D_i|}{S_R} \tag{80}$$

Dónde:  $S_R$  = es la desviación estándar de la reproducibilidad del método.

El valor t calculado es comparado con la t crítica para el nivel de confianza elegido por ejemplo 95%); en una tabla de dos colas con los grados de libertad resultado de los estudios de precisión.



### 1.3 Ejemplos de aplicación:

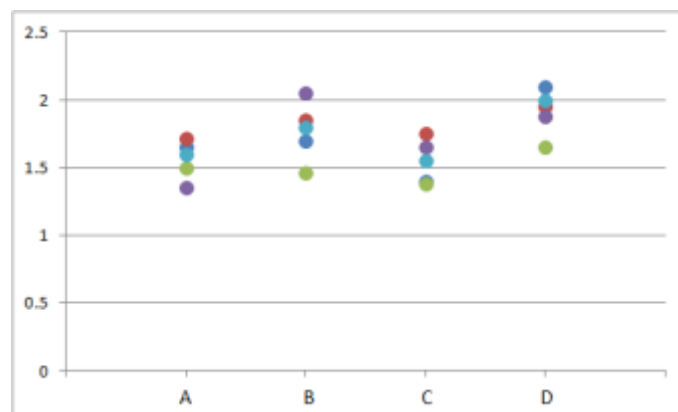
**1.3.1 Comparación del método original contra una variable:** Los experimentos de robustez en mediciones sencillas (en un solo nivel), en donde se compara directamente un valor o una serie de valores con otro de referencia ya fueron descritas en los temas de precisión, veracidad e intervalo lineal (Temas I y II).

**Comparación de un valor de referencia contra más de dos variables:** Ejemplo de una comparación sencilla (en un solo nivel) de más de dos medias obtenidas por cambios deliberados en las condiciones del proceso:

Un laboratorio realiza mediciones provocando cambios en tres variables consideradas significativas: B, C y D; el laboratorio efectúa cinco mediciones para analizar el efecto de cada una de estas variables. El proceso original corresponde a las mediciones A. Los resultados del experimento aparecen en la siguiente tabla.

Experimento	Mediciones					$n_i$	$\sum x_i$	$\sigma_x$	$\bar{x}_i$
A	1.65	1.72	1.50	1.35	1.60	5	7.84	0.144	1.568
B	1.70	1.85	1.46	2.05	1.80	5	8.86	0.216	1.772
C	1.40	1.75	1.38	1.65	1.55	5	7.73	0.159	1.546
D	2.10	1.95	1.65	1.88	2.00	5	9.58	0.169	1.916
Total:						20	34.01	-	1.700

a) Evaluación visual.: mediante un gráfico de dispersión.



Cada punto corresponde a una medición en el experimento identificado en el eje de las abscisas, se muestran los cinco puntos en cada experimento.

El resultado del gráfico es que no son claras las diferencias entre las mediciones para cada experimento; tomando como referencia los valores del experimento A (el método sin variación) visualmente parece que existe superposición en los valores con los demás experimentos.

**b) Evaluación por anova**

Se realiza el cálculo utilizando la herramienta de Excel; para un nivel de confianza  $\alpha=0.05$ . La salida de datos es la siguiente:

<i>Fuente de variación</i>	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>P-value</i>	<i>F crit</i>
Entre grupos	0.4703	3	0.1568	5.1708	0.0109	3.2389
Dentro de grupos	0.4850	16	0.0303			
Total	0.9553	19				

De acuerdo a los criterios definidos anteriormente:

- La F calculada (5.17) es mayor que la F crítica (3.23); por lo tanto al menos una de las medias no es estadísticamente igual.
- El valor P obtenido (0.01) es menor que el nivel de confianza definido (0.05); nos encontramos en la zona de rechazo, lo que confirma que las medias, o al menos una de ellas, no es estadísticamente igual.

El resultado del análisis por anova muestra que para alguna de las variaciones aplicadas el método no es robusto, existe al menos una media diferente pero no sabemos cuál es; hacemos uso de las pruebas descritas para este propósito.

- c) Prueba de la Diferencia Mínima Significativa; como tenemos el mismo número de mediciones en los cuatro experimentos utilizamos la fórmula:

$$DSM = \left| \overline{X}_i - \overline{X}_j \right| = t_{\alpha/2} \sqrt{\frac{2s^2}{n}}$$

Dónde:

$$t_{\alpha/2} = 2.12$$

Grados de libertad = (no. de experimentos) (n-1) = (4) (5-1)=16

$S^2$  =MS dentro de grupos= 0.030315

$$n = 5$$

Sustituyendo:

$$DSM = \left| \overline{X}_i - \overline{X}_j \right| = 2.12 \sqrt{\frac{2(0.030315)}{5}} = 0.2334$$

Tomando como referencia el valor del experimento A:

	$\left  \overline{X}_i - \overline{X}_j \right $	
A-B	1.568 – 1.772	0.204
A-C	1.568 – 1.546	0.022
A-D	1.568 – 1.916	<b>0.348</b>

La diferencia entre los valores de la media de A y D es la única que excede el valor de DSM; al parecer el método no es robusto para la variación del experimento D.

- d) Prueba de Tukey

$$\left| \overline{Y}_i - \overline{Y}_j \right| > T_{\alpha}$$

$$T_{\alpha} = q_{\alpha}(a, f) \sqrt{\frac{MS_E}{n}}$$

Dónde:

$$MS_E = 0.030315$$

$$n = 5$$

$$a = 4$$

$$f = 16$$

$$q_\alpha(a, f) = 4.046$$

Sustituyendo:

$$T\alpha = q_\alpha(a, f) \sqrt{\frac{MS_E}{n}} = 4.046 \sqrt{\frac{0.030315}{5}} = 0.31504$$

Tomando la misma tabla de diferencias mostrada para la prueba de DSM, también la diferencia entre el experimento A y D es mayor que el valor de  $T\alpha$ . Queda comprobado que el método no es robusto para la variable en D.

e) Prueba de Dunnett:

$$d_i = \frac{\bar{y}_i - \bar{y}_0}{\sqrt{\frac{2s^2}{n}}}$$

$$|d_i| > d_{\alpha/2}(k, v)$$

Dónde:

$$s^2 = 0.030315$$

$$n = 5$$

$$v = 16$$

$$k = 4$$

$$d_{\alpha/2}(k, v) = 2.59$$

Se sustituyen los valores en una tabla para cada una de las comparaciones entre experimentos:

A-B	$d_i = \frac{1.772 - 1.568}{\sqrt{\frac{2(0,030315)}{5}}}$	1.8525
A-C	$d_i = \frac{1.546 - 1.568}{\sqrt{\frac{2(0,030315)}{5}}}$	0.19978
A-D	$d_i = \frac{1.916 - 1.568}{\sqrt{\frac{2(0,030315)}{5}}}$	<b>3.1602</b>

Al igual que en las anteriores pruebas, el estudio muestra que en el experimento D se obtuvieron resultados estadísticamente diferentes al método original A. El método no es robusto para la variable utilizada en D.

### 1.3.2 Estudio de robustez para varias variables en dos niveles utilizando diseño de experimentos.

Para mostrar el uso de esta herramienta se muestra el siguiente ejercicio:

Se toman los datos del ejemplo de las tablas 6 a 7 de la especificación ASTM E 1169-14, que nos describe factores que pueden influir en la determinación de pH en una solución ácida diluida.

<i>Factor No.</i>	<i>Variable</i>	<i>Unidades</i>	<i>Nivel 1 (-)</i>	<i>Nivel 2 (+)</i>
A	Dilución con agua	si o no	No	Si
B	Adición de cloruro de potasio	si o no	No	Si
C	Tiempo de estabilización	minutos	5	10
D	Profundidad de inmersión del electrodo	cm	1	3
E	Adición de nitrato de sodio	si o no	No	Si
F	Agitación	si o no	No	Si
G	Temperatura	°C	2	4

El arreglo Plackett-Burman y los resultados obtenidos para los ocho experimentos se presentan a continuación:

	A	B	C	D	E	F	G	Resultado de la prueba
a	1	1	1	-1	1	-1	-1	3015
b	-1	1	1	1	-1	1	-1	3006
c	-1	-1	1	1	1	-1	1	2999
d	1	-1	-1	1	1	1	-1	2964
e	-1	1	-1	-1	1	1	1	3049
f	1	-1	1	-1	-1	1	1	2949
g	1	1	-1	1	-1	-1	1	3055
h	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	2904

Se calculan los factores (diferencias) para cada una de las variables, restando la suma de los niveles (1) a la suma de los niveles (-1).

$$D_A = \frac{a+d+f+g}{4} - \frac{b+c+e+h}{4} = \frac{3015+2964+2949+3055}{4} - \frac{3006+2999+3049+2904}{4} = 6.25$$

$$D_B = \frac{a+b+e+g}{4} - \frac{c+d+f+h}{4} = \frac{3015+3006+3049+3055}{4} - \frac{2999+2964+2949+2904}{4} = 77.25$$

$$D_C = \frac{a+b+c+f}{4} - \frac{d+e+g+h}{4} = \frac{3015+3006+2999+2949}{4} - \frac{2964+3049+3055+2904}{4} = -0.75$$

$$D_D = \frac{b+c+d+g}{4} - \frac{a+e+f+h}{4} = \frac{3006+2999+2964+3055}{4} - \frac{3015+3049+2949+2904}{4} = 26.75$$

$$D_E = \frac{a+c+d+e}{4} - \frac{b+f+g+h}{4} = \frac{3015+2999+2964+3049}{4} - \frac{3006+2949+3055+2904}{4} = 28.25$$

$$D_F = \frac{b+d+e+f}{4} - \frac{a+c+g+h}{4} = \frac{3006+2964+3049+2949}{4} - \frac{3015+2999+3055+2904}{4} = -1.25$$

$$D_G = \frac{c+e+f+g}{4} - \frac{a+b+d+h}{4} = \frac{2999+3049+2949+3055}{4} - \frac{3015+3006+2964+2904}{4} = 40.75$$

Se analizan los factores obtenidos para identificar aquellas variaciones que, de acuerdo al experimento, afectan al método:

- El primer lugar se tiene el factor B, adición de cloruro de sodio, como la variable que más afecta el resultado cuando se hacen cambios; en este caso si se agrega a no.
- En segundo lugar se tiene la variable G, temperatura, por ello muchos fabricantes tienen incorporado en sus equipos un control de temperatura.
- Las variables E, adición de nitrato de sodio, y D, profundidad de la inmersión del electrodo, tienen cierta influencia sobre el resultado, por lo que podrían ser analizadas más a fondo.
- Por otra parte están los factores cuyas variaciones parecen no afectar de forma considerable los resultados obtenidos: c, tiempo de estabilización, F, agitación y por ultimo a, disolución en agua.

A partir de este análisis, el laboratorio puede repetir el diseño utilizando un material de referencia y tomar en cuenta sólo las variables relevantes a fin de establecer las mejores condiciones de prueba.

Al utilizar un material estándar y un valor de precisión de referencia para el método (desviación estándar o reproducibilidad), pueden aplicarse las ecuaciones descritas en 1.2.2.2 en la sección de evaluación de resultados.

#### 1.4 Conclusiones.

El parámetro de robustez suele ser una de los que más causan problemas a los laboratorios que requieren validar métodos. En los métodos químicos, lo más importante es el conocimiento sobre el proceso, esto ayudara a identificar las variables que son importantes y optimizar los trabajos.

Como se ha mostrado, la determinación y evaluación se puede realizar tanto de forma individual para cada variable (en donde se utilizan herramientas descritas en el tema anterior) como en forma conjunta; el trabajar varias variables a la vez suele hacer un poco más complejas las herramientas estadísticas, por eso algunos usuarios suelen apoyarse de paquetes estadísticos. El uso de estos programas es bueno siempre y cuando se esté consciente de que es lo que se quiere obtener y de cómo realiza el cálculo; de cualquier forma se mostró que utilizar hojas de cálculo es relativamente sencillo e igualmente eficiente, solo se debe tener cuidado al realizar operaciones largas



## 2.0 SENSIBILIDAD

### 2.1 Definiciones:

**Sensibilidad:** en metrología y química analítica. Pendiente de la curva de calibración. Si la curva es de hecho “una curva” en vez de una línea recta, entonces la sensibilidad estará en función de la concentración o cantidad del analito. Si la sensibilidad es una característica de desempeño única, debe depender sólo del proceso de medición, no de factores de escalas o niveles.

La sensibilidad de un método es su capacidad para diferenciar dos cantidades o dos concentraciones de analitos muy parecidas. (IUPAC, 1997)

Pendiente de la curva de respuesta, es decir, el cambio en la respuesta del instrumento que corresponde a un cambio en la concentración del analito. Cuando se ha establecido que la respuesta es lineal con respecto a la concentración (o sea, dentro del intervalo lineal del método) y se ha determinado la intercepción de la curva de respuesta, la sensibilidad es un parámetro útil para calcular y usar en fórmulas de cuantificación. (Eurachem, 2014)

**Sensibilidad instrumental:** es la proporción del cambio en la respuesta de medición del instrumento con el cambio en la concentración de un analito. Corresponde a la pendiente de la curva de calibración

## 2.2 Determinación de la sensibilidad

La sensibilidad puede representarse como el cambio en la respuesta analítica dividida por el correspondiente cambio en la concentración del analito; por ejemplo, a un valor dado de concentración  $Z_0$ :

$$\text{Sensibilidad} = S = \left( \frac{dy}{dz} \right)_{z_0} \quad (81)$$

De esta forma la sensibilidad se establece como una relación, dicha relación no debiera diferir en diferentes concentraciones dentro del intervalo de interés. Como se mencionan en la definición, no depende de escalas o niveles.

Para un mismo incremento en la respuesta ( $\Delta y$ ,  $dy$ ), un método con mayor sensibilidad tendrá más capacidad para discriminar entre cantidades más pequeñas de analito. Bajo este concepto se pueden establecer varios tipos de sensibilidad.

### 2.2.1 Sensibilidad instrumental:

Para métodos de prueba cuyo proceso de análisis es por medios instrumentales, y si la calibración es lineal, la sensibilidad es justamente la pendiente ( $b$ ) de la curva de calibración, ya que nos representa la relación mencionada anteriormente.

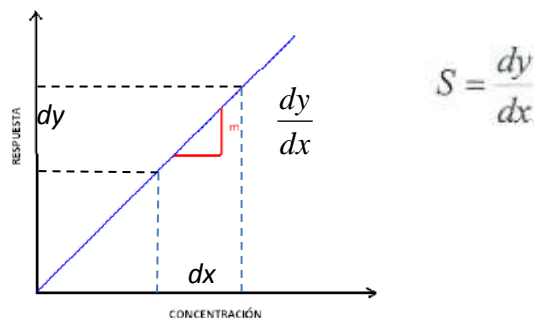


Figura 6: Definición de sensibilidad como pendiente  
(Instituto de Salud Pública de Chile, 2010)

Siguiendo la expresión de la línea recta:

$$y = bx_i + x_0$$

Dónde:

$y$  = señal medida

$x_i$  = concentración del analito

$x_0$  = señal del instrumento para el blanco

$b$  = pendiente de la línea recta

El cálculo de la sensibilidad, a través de la pendiente de la recta de calibrado ( $b$ ), puede realizarse mediante la ecuación:

$$b = \frac{\sum_i (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}$$

Dónde:

$\bar{y}$  = media o punto medio de los valores de  $y$

$\bar{x}$  = media o punto medio de los valores de  $x$

$y_i$  = valores individuales de  $y$

$x_i$  = valores individuales de  $x$

### 2.2.2 Sensibilidad analítica

La sensibilidad de calibración no es adecuada para comparar dos métodos analíticos cuando éstos están basados en respuestas de diferente naturaleza (por ejemplo, absorbancia y fluorescencia, o absorbancia y medidas electroquímicas, etc.). Para ello es preferible utilizar la llamada sensibilidad analítica, definida por la relación entre la sensibilidad instrumental y el ruido instrumental:

$$\gamma = \frac{b_1}{s_s} \tag{82}$$

Dónde:

$s_s$  es una medida conveniente del nivel de ruido en la respuesta.

Para estimar el nivel de ruido pueden usarse dos procedimientos, que en teoría deberían coincidir.

- En el primero, se estima el ruido instrumental ( $s_s$ ) a través de los desvíos de las réplicas de las mediciones de calibrado respecto de sus promedios:

$$s_y = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^r (y_{ij} - \bar{y}_i)^2}{m - p}} \quad (83)$$

Dónde:

- $p$  : número de niveles de concentración estudiados en la recta,
- $r$  : número de réplicas de cada punto,
- $y_{ij}$  : valor de la respuesta correspondiente a cada nivel y réplica, e
- $\bar{y}_i$  : promedio de las respuestas de las réplicas para cada nivel de concentración.

En la ecuación, el número de grados de libertad es  $m - p$ , ya que de los  $m$  datos disponibles,  $p$  grados de libertad se reservan para el cálculo de las  $p$  medias  $\bar{y}_i$ .

- En el segundo método de estimación del nivel de ruido, se estima como la desviación estándar de los residuos de la regresión lineal, por el parámetro  $s_{y/x}$ .

$$s_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n - 2}} \quad (84)$$

Si los datos estudiados cumplen la relación lineal entre respuesta y concentración, los dos métodos anteriormente descritos deben proveer resultados similares en cuanto a la estimación del ruido instrumental (Olivieri, 2002).

### 2.2.3 Sensibilidad en métodos no instrumentales.

Aunque la mayoría de los métodos analíticos involucran curvas de calibración pueden encontrarse métodos en los cuales no se aplican.

En estos casos lo más recomendable es realizar mediciones utilizando materiales de referencia en concentraciones tan cercanas como la sensibilidad que se espera demostrar. Se requiere contar con al menos un par de concentraciones con su correspondiente respuesta, de forma que la sensibilidad pueda representarse por la relación  $s = dy/dx$

## 2.3 Evaluación de la sensibilidad obtenida

**Pruebas de paralelismo:** Cuando dos líneas tienen igual pendiente se dice que son paralelas, las pruebas que se describen a continuación describen forma de evaluar la perpendicularidad y por lo tanto la similitud en la pendiente entre rectas.

### 2.3.1 Comparación visual de rectas

La comparación de los valores de pendiente de cada modelo de regresión puede evidenciar la existencia de diferencias en la respuesta. Para realizar este tipo de evaluación es necesario tener al menos tres puntos por curva de calibración, se grafica en una misma gráfica y se verifica si existen cambios en la pendiente, ver figura 7 como ejemplo.

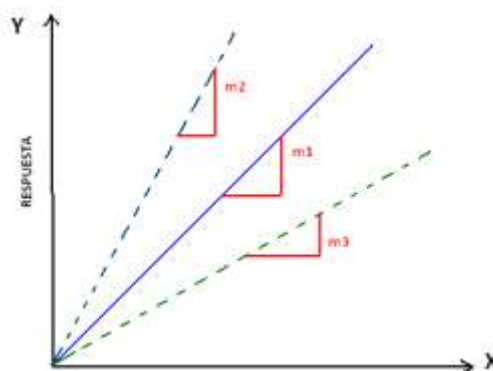


Figura 7 (Instituto de Salud Pública de Chile, 2010)

**Criterio de aceptación:**

- Mientras mayor sea la pendiente de la recta (en este caso la recta  $c$  tienen la mayor pendiente) el método es más sensible; esto es que aunque hay una pequeña diferencia en concentración( $x$ ) se obtiene una buena diferencia en la respuesta ( $y$ ).
- La sensibilidad puede evaluarse también por el grado de precisión de las mediciones realizadas; esto es, la reproducibilidad de un método puede afectar la sensibilidad. La sensibilidad, la precisión y las curvas de calibración están relacionadas. Las curvas de Calibración son adecuadas si las desviaciones estándar de las mediciones son despreciables con respecto a la señal promedio. Cuando dos curvas de calibración tienen pendientes iguales, la que presenta mejor precisión (menor valor de dispersión) es más sensible.

**2.3.2 Comparación de pendientes por  $t$  de Students.**

Se desea probar la hipótesis nula de que la pendiente  $b$  es igual a algún valor especificado  $b_0$  (pendiente inicial u original)

$$t_{calculada} = \frac{b - b_0}{\sqrt{\frac{MC_E}{s_{xx}}}} ; \text{ Para } v = n - 2 \quad (85)$$

Dónde:

$MC_E/s_{xx}$ = intervalo de confianza de la pendiente o error estándar de la pendiente  
(e)

El error estándar de la pendiente se obtiene con las siguientes fórmulas:

$$MC_E = \sigma^2 = \frac{SC_E}{n - 2} \quad (86)$$

$$SC_E = \sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2$$

$$S_{xx} = \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 = \sum_{i=1}^n x_i^2 - \frac{1}{n} \left( \sum_{i=1}^n x_i \right)^2 \quad (87)$$

**Criterio de aceptación:**

- Si  $|t_{calculada}| < t_{\alpha/2}$ , para n-2 grados de libertad y el nivel de confianza elegido, entonces no hay diferencia en las pendientes y, por lo tanto, no hay cambios en la sensibilidad del proceso analítico.
- si  $|t_{calculada}| > t_{\alpha/2}$ , representa un cambio significativo en alguna de las pendientes.

**2.3.3 Comparación de pendientes por prueba F**

Cuando se busca analizar más de dos pendientes de forma simultánea, las pendientes son comparadas estadísticamente a partir de sus modelos de regresión; para esto se emplea una prueba F convencional; en donde se compara una F calculada contra una F crítica o de tablas, a un nivel de confianza determinado.

Hipótesis nula:  $H_0: b_1 = b_2 = \dots = b_k$

Hipótesis alterna:  $H_i = b_i \neq b_j$

La fórmula para obtener F es la siguiente:

$$F_c = \frac{\left( \frac{SC_c - SC_p}{k - 1} \right)}{\frac{SC_c}{GL_p}} \quad (88)$$

Dónde:

$SC_c$  = suma de cuadrados residual común

$SC_p$  = suma de cuadrados residual agrupado (sumatoria de las sumas de cuadrados residuales para cada regresión)

$GL_p$  = Grados de libertad residual agrupado

$k$  = número de modelos de regresión (número de pendientes a evaluar)

$F_{tablas}(\alpha, \nu_1, \nu_2)$  con  $\nu_1$ ,  $\nu_2$  grados de libertad del numerador y denominador respectivamente.

Los componentes de la fórmula se pueden obtener por medio de las relaciones mostradas en la siguiente tabla: Cálculos para la prueba de diferencias entre pendientes de  $k$  regresiones lineales simples.

	$A_i = \sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}$		$C_i = \sum y_i^2 - \frac{(\sum y_i)^2}{n}$		
		$B_i = \sum xy_i = \frac{(\sum x)(\sum y_i)}{n}$		SC residual	GL residual
Regresión 1	$A_1$	$B_1$	$C_1$	$SC_1 = C_1 - \frac{B_1^2}{A_1}$	$GL_1 = n_1 - 2$
Regresión 2	$A_2$	$B_2$	$C_2$	$SC_2 = C_2 - \frac{B_2^2}{A_2}$	$GL_2 = n_2 - 2$
Regresión k	$A_k$	$B_k$	$C_k$	$SC_k = C_k - \frac{B_k^2}{A_k}$	$GL_k = n_k - 2$
Regresión agrupada				$SC_p = \sum_{i=1}^k SS_i$	$GL_p = \sum_{i=1}^k (n_j - 2)$
Regresión común	$A_c = \sum_{i=1}^k A_i$	$B_c = \sum_{i=1}^k B_i$	$C_c = \sum_{i=1}^k C_i$	$SC_c = C_c - \frac{B_c^2}{A_c}$	$GL_c = \sum_{i=1}^k (n_j - k - 1)$

(Patiño, et al. 2007)

Tabla 12



**Criterio de aceptación:**

- Sí  $F_{tablas}(\alpha, \nu_1, \nu_2) \leq F_c$ ; Alguno de los valores de sensibilidad presentados es estadísticamente diferentes.  
Bajo este criterio puede hacerse una prueba t para diferenciar entre pares de valores, se sugiere colocar los valores en orden ascendente e iniciar la prueba con los valores de los extremos.
- Sí  $F_c \leq F_{tablas}(\alpha, \nu_1, \nu_2)$ ; No hay evidencia de que los valores de sensibilidad obtenidos sean estadísticamente diferentes.

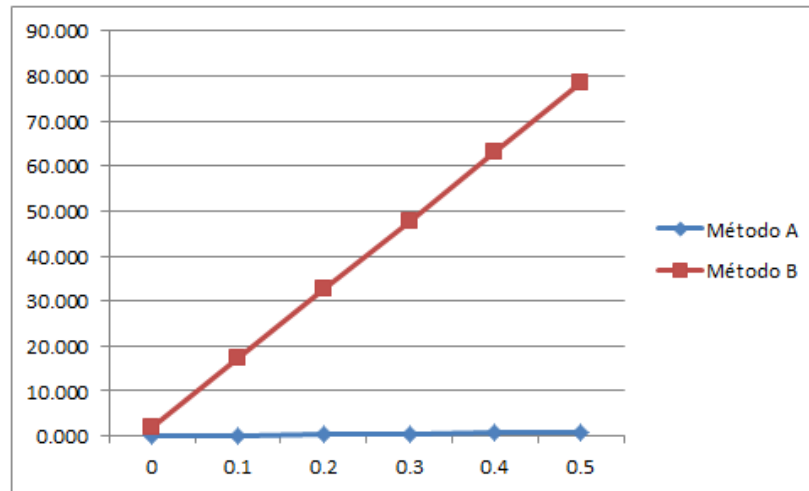
**2.4 Ejemplos de aplicación.**

**2.4.1 Ejemplo 1:** Se analiza una serie de muestras patrón mediante dos métodos analíticos, uno basado en medidas de absorbancia y otro basado en medidas de fluorescencia. Los resultados se muestran en la siguiente tabla.

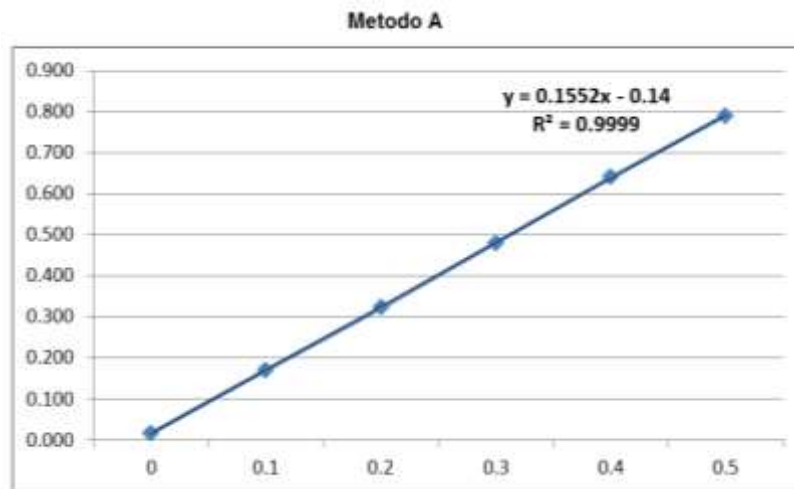
Concentración del patrón	Método A			Método B		
	Respuesta 1	Respuesta 2	Respuesta 3	Respuesta 1	Respuesta 2	Respuesta 3
0.000	0.01	0.02	0.02	2.0	1.9	1.9
0.100	0.17	0.17	0.17	17.4	17.4	17.3
0.200	0.32	0.33	0.32	32.5	32.6	32.6
0.300	0.48	0.48	0.48	47.8	47.8	48.0
0.400	0.64	0.64	0.64	63.2	63.3	63.3
0.500	0.79	0.79	0.79	78.4	78.5	78.4

¿Cuál de estos métodos puede considerarse más sensible?

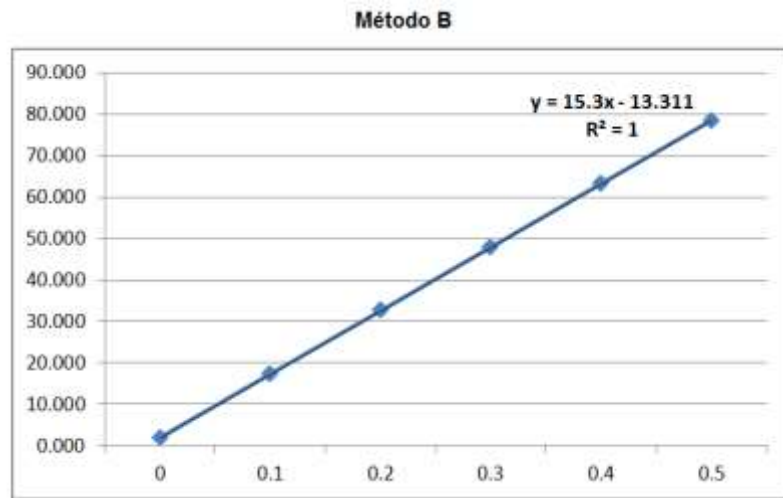
- a) Método gráfico: No es práctico hacer una sola gráfica con los valores de los dos métodos, pues los resultados entre uno y otro método están en diferente nivel de las ordenadas (y), por lo que no es posible hacer una comparación visual del comportamiento de las curvas de ambos métodos.



- Se grafican los promedios de las respuestas contra los valores de los estándares y su correspondiente ecuación lineal para cada uno de los métodos por separado:



- La pendiente de la curva del método A es 0.1552 por tanto la relación respuesta contra cambio ( $dy/dx$ ) en la concentración es 0.1552; como el cambio en la concentración del estándar es de 0.100 se puede interpretar que por cada 0.100 unidades de concentración hay una variación de 0.1552 unidades de respuesta.



La pendiente de la curva del método B es 15.3 así que la relación respuesta contra cambio en la concentración ( $dy/dx$ ) es 15.3. Al igual que en el método A el cambio en la concentración del estándar es de 0.100, lo que implica que por cada 0.100 unidades de concentración hay una variación de 15.3 unidades de respuesta.

Dado que la sensibilidad está definida como ( $dy/dx$ ) y que la diferencia entre ambas sensibilidades es bastante visible, no es necesario utilizar ninguna herramienta adicional; el método B es más sensible que el método A.

**1.4.2 Ejemplo 2:** En el análisis de un compuesto se realizan dos curvas de calibrado empleando dos longitudes de onda diferentes. Los resultados se presentan en las siguientes tablas:

Caso A				
Muestra	Concentración	Respuesta 1	Respuesta 2	Respuesta 3
1	0.000	0.78	0.80	0.82
2	0.198	3.38	3.44	3.51
3	0.392	5.75	6.16	6.01
4	0.583	8.53	8.51	8.68
5	0.769	10.97	11.04	10.89
6	0.950	13.40	13.08	13.37

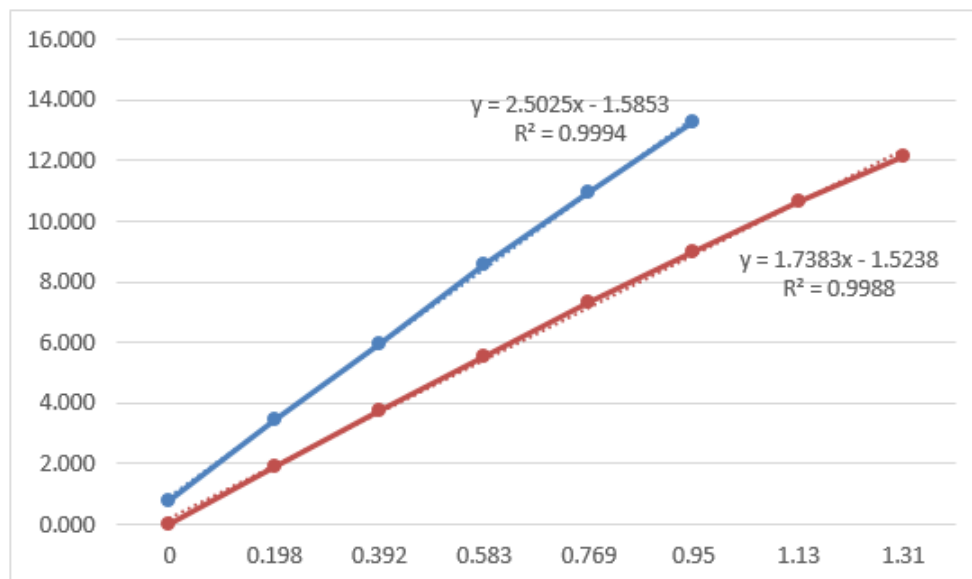
Caso B

Muestra	Concentración	Respuesta 1	Respuesta 2	Respuesta 3
1	0.000	0.01	0.03	0.04
2	0.198	1.96	1.88	1.90
3	0.392	3.75	3.75	3.80
4	0.583	5.59	5.52	5.56
5	0.769	7.30	7.35	7.27
6	0.950	9.07	8.95	9.03
7	1.130	10.83	10.71	10.46
8	1.310	12.08	12.11	12.21

¿En cuál de los dos casos el método es más sensible?

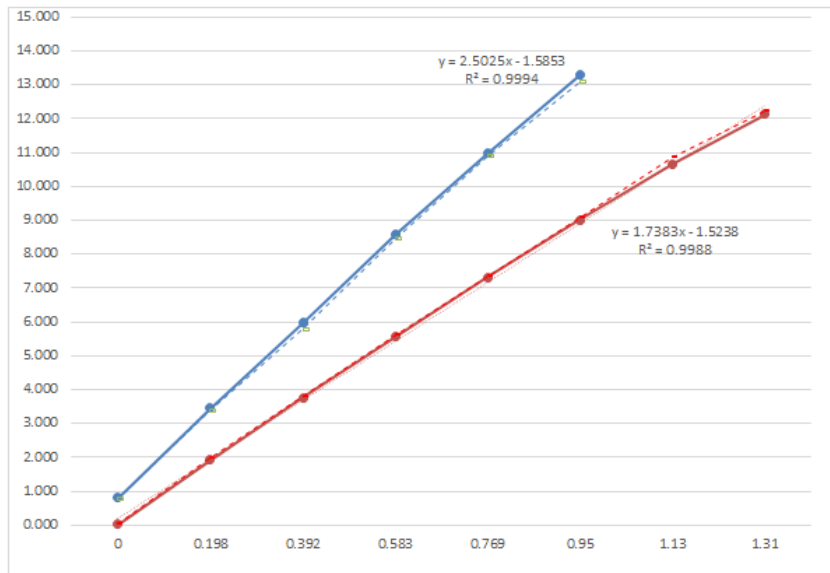
a) Método gráfico:

- Debido a que en este ejemplo se usó el mismo intervalo para los dos casos (longitudes de onda), se pueden presentar ambas curvas de calibración en una sola gráfica.



La línea azul (línea superior) representa al método A y la línea roja (línea inferior) al método B. Aparentemente el método A tiene una mayor pendiente, lo que implica que es más sensible.

La siguiente gráfica incluye los valores de dispersión (desviación estándar) de cada uno de los puntos de las curvas como líneas punteadas, valores inferiores en el caso A y valores superiores en el caso B; aun considerando la dispersión la diferencia en la pendiente entre ambas curvas es notoria.



A fin de corroborar la anterior, y como ejemplo de un método estadístico, se usará la prueba t.

- b) Prueba t:** Se toma como referencia el caso A, es decir, se busca verificar que al cambio de longitud de onda para el caso B se tiene un cambio en la sensibilidad del método

Ho:  $b \neq b_0$ . Para  $n=6$

$$t_{calculada} = \frac{b - b_0}{\sqrt{\frac{MC_E}{s_{xx}}}} \quad ; \quad MC_E = \hat{\sigma}^2 = \frac{SC_E}{n - 2}$$

$$SC_E = \sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2$$

Para el cálculo de  $SC_E$  se toman los resultados de Excel, estos son obtenidos al momento de solicitar la regresión y función (ecuación) de la línea.

La salida de datos en Excel es la siguiente.

Observación	Pronóstico para Y	Residuos	Residuos estándares	Cuadrado de los residuales
1	0.82804703	-0.02804703	-0.6656864	0.000786636
2	3.434616922	0.00871641	0.20688095	7.59758E-05
3	5.988528837	-0.0151955	-0.3606599	0.000230903
4	8.502947268	0.07038607	1.67058847	0.004954198
5	10.95154323	0.01512344	0.3589495	0.000228718
6	13.33431671	-0.05098338	-1.2100726	0.002599305

$$SC_E = \text{Suma} = 0.008875737$$

$$MC_E = \sigma^2 = \frac{SC_E}{n-2} = \frac{0.008875}{6-2} = 0.002218934$$

Concentración del material de referencia	Método A	
	Promedio de lecturas ( $y_i$ )	Cuadrado de $x_i$
0	0.800	0.0
0.198	3.443	0.04
0.392	5.973	0.15
0.583	8.573	0.34
0.769	10.967	0.59
0.95	13.283	0.90
	Suma	2.03

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

$$S_{xx} = \sum_{i=1}^n x_i^2 - \frac{1}{n} (\sum_{i=1}^n x_i)^2$$

$$\sum_{i=1}^n x_i^2 = 2.03$$

$$(\sum_{i=1}^n x_i)^2 = (2.892)^2 = 8.363664$$

$$S_{xx} = \sum_{i=1}^n x_i^2 - \frac{1}{n} (\sum_{i=1}^n x_i)^2 = 2.03 - \frac{1}{6} (8.363664) = 0.636056$$

$$t_{calculada} = \frac{b - b_o}{\sqrt{\frac{MC_E}{S_{xx}}}} = \frac{1.7383 - 2.5025}{\sqrt{\frac{0.0022189}{0.636056}}} = 12.938$$

$$t_{tablas}^{0.05, 6-2} = 2.776$$

$|t_{calculada}| > t_{\alpha/2, n-2}$ ; Por lo tanto si hay un cambio en la sensibilidad del caso A al

caso B.

A tiene una mayor pendiente, lo que lo hace más sensible.

Por último, se utiliza la prueba F para verificar la diferencia entre pendientes. Recordemos que este ejercicio se resolvió con el método gráfico; el uso de los estadísticos t y F se desarrollan como ejemplo para cuando no se sea posible tomar una decisión con el método visual o mediante comparación directa de las pendientes.

- c) Prueba F: Esta herramienta es recomendable cuando se tienen más de dos curvas de calibración a comparar; Se requiere usar la siguiente fórmula:

$$F_c = \frac{\left( \frac{SC_c - SC_p}{k-1} \right)}{\frac{SC_c}{GL_p}}$$

Tomado los valores del ejemplo 2:

Concentración del material de referencia	Caso A (y <sub>i</sub> )	Caso B (y <sub>2</sub> )	x <sup>2</sup>	y <sub>1</sub> <sup>2</sup>	y <sub>2</sub> <sup>2</sup>	
0	0.800	0.027	0	0.640	0.001	
0.198	3.443	1.913	0.0392	11.854	3.660	
0.392	5.973	3.767	0.1537	35.677	14.190	
0.583	8.573	5.557	0.3399	73.496	30.880	
0.769	10.967	7.307	0.5913	120.275	53.392	
0.95	13.283	9.017	0.9025	176.438	81.306	
1.13	-	10.667	1.2769	-	113.785	
1.31	-	12.133	1.7161	-	147.210	
Sumatorias A	2.892	43.039	50.388	2.0266	418.38	444.424
Sumatorias B	5.332			5.0196		

Se obtienen los valores usando las relaciones mencionadas en la siguiente tabla.

	$A_i = \sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}$	$B_i = \sum xy_i = \frac{(\sum x)(\sum y_i)}{n}$	$C_i = \sum y_i^2 - \frac{(\sum y_i)^2}{n}$	SC residual	GL residual
Sumatorias A	0.63267	20.7447	109.6545	-570.5483	4
Sumatorias B	1.4658	33.5836	127.0551	-642.3728	6
				-1212.9211	12
	2.0985	54.3284	236.7097	-1169.7975	11

- Se sustituyen en la fórmula:

$$F_c = \frac{\left( \frac{SC_c - SC_p}{k - 1} \right)}{\frac{SC_c}{GL_p}} = \frac{(-1169.797499 - (-1212.921118))}{\frac{-1169.797499}{12}} = \frac{43.1236}{97,4831} = 0.4423$$

- Se compara contra F de tablas (critico) de dos colas  $\alpha/2$  de 0.05/2; en el numerador el número de grados de libertad es 1, pues sólo se tienen dos casos en el estudio y en el denominador los grados de libertad son 12. (número total de datos menos 2)

$$F_{\text{critica}} = 6.554$$

$$F_{\text{calculada}} < F_{\text{critica}}$$

Por esta herramienta no hay evidencia de diferencia en la sensibilidad de las dos rectas de calibración; lo que indica que el análisis por este medio es menos estricto. Esto puede deberse a que sólo se están comparando dos casos y esta herramienta es más indicada cuando se tiene un número mayor de dos.



## 2.5 Conclusiones.

La sensibilidad es un parámetro muy necesario cuando se trabaja con elementos a baja concentración; como se ha visto en el desarrollo de este tema, muchas veces se determina la sensibilidad a través de la respuesta instrumental y esto no es correcto, pues no se están considerando todos los pasos previos de manipuleo de la muestra (muestreo, preparación de muestras, etc.), y en el caso de los métodos no instrumentales, como las titulaciones, deja al usuario con la duda de aplicar o no este parámetro en la validación de su método.

Siempre es preferible utilizar metodologías simples para evaluar los resultados, en el caso de la sensibilidad se mostró que el uso de gráficos es bastante aceptable y, si se requiere una evaluación más cuantitativa, la comparación de la relación respuesta analítica- cambio en la concentración, indica de forma clara cuándo se tiene un método más sensible que otro.

### 3.0 SELECTIVIDAD

#### 3.1 Definiciones

**3.1.1** Selectividad de un sistema de medición: propiedad de un sistema de medición, usado con un procedimiento específico de medición, donde éste vale cuantitativamente medido para uno o más mensurandos de forma tal que dichos mensurandos son independientes de otras cantidades en la muestra o espécimen a ser investigado. (VIM, 2012)

**3.1.2** Selectividad es el grado en el cual un método puede cuantificar exactamente el analito en la presencia de interferentes. Idealmente, la selectividad debiera ser evaluada para cada interferente importante que pudiera estar presente. Es particularmente importante verificar los interferentes probables, sobre principios químicos, para apoyar a la prueba. Puede ser impráctico considerar o analizar cada interferente potencial, donde éste sea el caso, es recomendable que los peores casos sean analizados. (IUPAC, 2002)

**3.1.3** Selectividad es definida por IUPAC como “la extensión en la cual el método puede ser usado para determinar analitos particulares en mezclas o matrices sin interferencias de otros componentes de comportamiento similar”. (IUPAC Recommendations 2001) (Hopkins et al., 2008)

**3.1.4** Selectividad (o Especificidad): ‘La capacidad de un método para determinar exactamente y específicamente el analito de interés en presencia de otros componentes en una matriz de muestra bajo las condiciones de prueba establecidas.’ [NATA Tech Note #13] (Eurachem, 2014)

### 3.1.5 Especificidad:

‘La capacidad de un método para medir solamente lo que se pretende que mida.’

[AOAC - PVMC]

**3.1.6** La especificidad es la capacidad de determinar el analito inequívocamente en presencia de componentes los cuales se espera que estén presentes. Comúnmente, esto puede incluir impurezas, degradantes, matriz, etc.’ (Eurachem, 2014)

## 3.2 Determinación de la selectividad

La selectividad de un método investiga la capacidad para medir el analito de interés, algunos de los factores que pueden causar variación en los resultados son:

**3.2.1 Efecto de interferencias:** las interferencias potencialmente presentes en una muestra pueden:

- a) Distorsionar la señal del analito de interés.
- b) Aumentar o disminuir la señal del analito de interés.

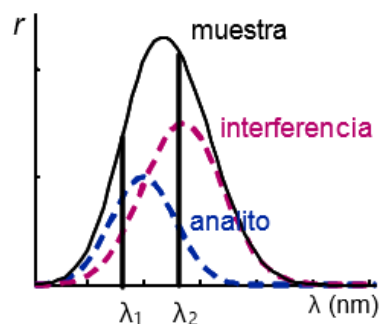


Figura 8 Efecto sustractivo de la interferencia sobre la concentración  
(Boque, 2005)

- c) Provocar un error sistemático:
  - Constante. (No depende de la concentración de analito)
  - Proporcional (Si depende da la concentración de analito)
- d) Disminuir la precisión en calibración multicomponente.

Para determinar la posible afectación se pueden realizar los siguientes estudios:

- a) Estudiando la capacidad de un método para medir un analito comparado con otros métodos o técnicas independientes, el proceso a seguir es:
  - Analizar muestras de composición y concentración conocida (materiales de referencia, MRC) mediante el método candidato y otros métodos independientes.
  - Examinar los resultados obtenidos por las técnicas elegidas.
  
- b) En porciones de prueba (muestras) a las cuales deliberadamente se han introducido interferencias específicas (aquellas que se cree probable que estén presentes en las muestras), el proceso general es el siguiente:
  - Analizar muestras que contienen diferentes interferencias sospechosas en presencia del analito de interés.
  - Analizar los efectos de las interferencias: si la presencia de las interferencias disminuyen (efecto sustractivo) o aumentan (efecto aditivo) la cantidad esperada del analito.

**3.2.1.2** La selectividad puede reportarse en porcentaje como “100% selectivo” cuando se tiene ausencia de efecto interferentes. Dado que la forma en que se reporta es similar a la utilizada para la recuperación, es válido utilizar los mismos criterios presentados para este parámetro.

**3.2.1.3** Para realizar este cálculo, y establecer los criterios de aceptación, debe considerarse la incertidumbre del método.

**3.2.2 Efecto matriz:** Los errores sistemáticos proporcionales debidos al efecto matriz pueden evaluarse con la técnica de las adiciones estándar. Para llevar a cabo este experimento se va adicionando a una muestra de blanco (o a una muestra de concentración conocida) diferentes cantidades del interferente. La evaluación puede realizarse dependiendo del alcance del experimento:

**3.2.2.1** Una medición cuantitativa de la selectividad puede presentarse por el “índice de selectividad”

$$b_{an} / b_{int} \quad (89)$$

Donde

$b_{an}$  : es la sensibilidad del método (pendiente de la función de la calibración), y

$b_{int}$  : la pendiente de la respuesta independiente producida por un interferente potencial, la cual provee una medida cuantitativa de la interferencia.

$b_{int}$  puede ser determinado, en forma aproximada, llevando a cabo un análisis en una matriz de blanco y después analizando el mismo blanco adicionado con el interferente potencial a una concentración apropiada y conocida. Si la matriz del blanco no está disponible, se puede utilizar en su lugar un material típico, por ejemplo una muestra de rutina de concentración conocida.

$b_{int}$  puede ser estimado a partir de un experimento simple, para ello se debe asumir que los efectos por las interacciones de los componentes de la matriz no están presentes; Por ello es preferible utilizar una matriz del blanco que una matriz que contenga el analito.

### 3.3 Evaluación de la selectividad

**3.3.1** Cuando en un estudio se tiene aparentemente un 100% de selectividad, es decir que se obtiene el 100% del elemento a analizar, es recomendable realizar una verificación de los resultados obtenidos utilizando un segundo método analítico.

**3.3.2** Si se realiza el estudio de selectividad para una sola concentración del analito utilizando un material de referencia el laboratorio tendrá un valor obtenido contra un valor esperado, puede aplicarse entonces una prueba t para la evaluación del sesgo o de la recuperación.

Las metodologías para la determinación y evaluación del sesgo y la recuperación están descritas en el tema I.

Si el experimento se realizó en varias concentraciones del analito se compara la pendiente de la recta de patrones contra la pendiente de la recta obtenida en las soluciones adicionadas. Esta metodología solo es aplicable a métodos que siguen un comportamiento lineal y se espera que las rectas sean paralelas.

La metodología para la comparación de pendientes está descrita en el parámetro de robustez al inicio de este tema.

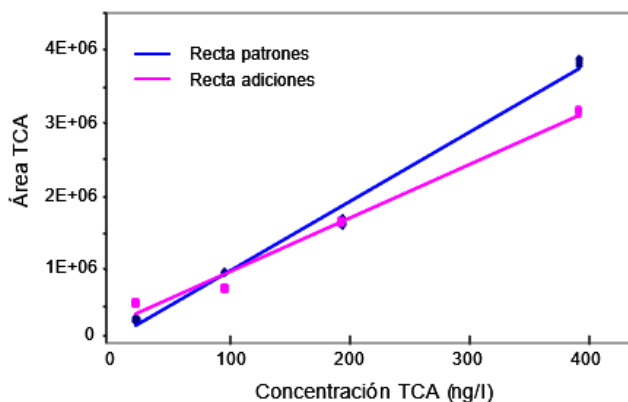


Figura 13 (Boque, 2005)

**3.3.4** Como también la precisión del método puede verse afectada, se recomienda hacer una comparación de la precisión obtenida con las muestras patrón y con las muestras adicionadas. Puede hacerse uso de las herramientas descritas para el parámetro de precisión.

**3.4 Ejemplos de aplicación:** ejemplos de evaluación de sesgo, recuperación, precisión y pendiente pueden encontrarse en el tema I y al inicio de este tema III.

### 3.5 Conclusiones

El parámetro de selectividad (o especificidad como algunos autores lo llaman), no es un tema que se describa mucho en los documentos de validación; por un lado porque su aplicación es obligada sólo en métodos nuevos, y por otro lado a que, como se ha visto, las herramientas utilizadas para su determinación y evaluación suelen ser las mismas que se utilizan en la determinación y evaluación de otros parámetros.

Esta situación, lejos de ser un problema, es muy conveniente para los laboratorios, ya que bajo las condiciones adecuadas se optimizan recursos al evaluar al mismo tiempo más de un parámetro.

## CONCLUSIONES GENERALES

En este trabajo se mostró que la validación de un método analítico se realiza con herramientas estadísticas de uso general, algunas de ellas pueden usarse en el estudio de varios parámetros (por ejemplo las pruebas t y F). Las herramientas estadísticas aquí descritas no son las únicas que un laboratorio puede usar para validar un método analítico, la intención es mostrar algunas de uso común y aplicación general.

La intención de iniciar cada parámetro con la definición es hacer hincapié en la importancia de comprender el objeto de cada uno de ellos antes de iniciar su determinación.

Es muy recomendable que el laboratorio haga una planeación antes de iniciar su estudio de validación, ya que si previamente analiza los pasos a seguir se dará cuenta que puede optimizar muchos recursos en la determinación y evaluación de sus parámetros.

Esta planeación debiera incluir lo siguiente:

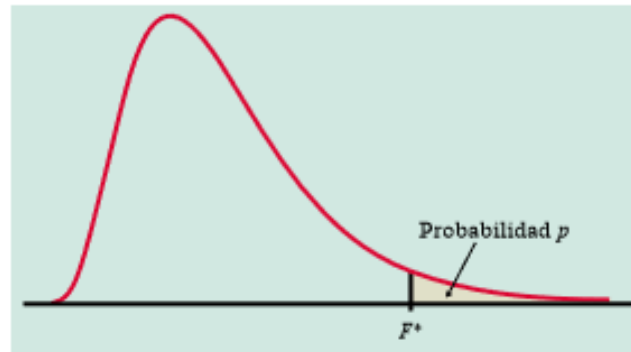
- Parámetros que se buscan determinar.
- Información con la que se cuenta.
- Recursos: equipo, personal, tiempo
- Si se tienen una metodología ya establecida.
- Si se debe cumplir con criterios ya establecidos

No se pretende sustituir metodologías oficiales o establecidas para los métodos analíticos de interés.



### Anexo I. Constantes estadísticas

#### Valores críticos de la distribución F de Fisher



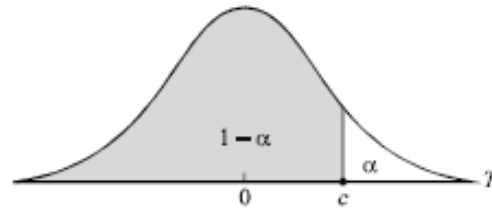
El valor de la tabla para  $p$  es el valor crítico  $F^*$  que deja la probabilidad  $p$  a la derecha

		Valores críticos de la distribución F de Fisher								
		Grados de libertad en el numerador								
$p$		1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	.100	39.86	49.50	53.59	55.83	57.24	58.20	58.91	59.44	59.86
	.050	161.45	199.50	215.71	224.58	230.16	233.99	236.77	238.88	240.54
	.025	647.79	799.50	864.16	899.58	921.85	937.11	948.22	956.66	963.28
	.010	4052.2	4999.5	5403.4	5624.6	5763.6	5859.0	5928.4	5981.1	6022.5
	.001	405284	500000	540379	562500	576405	585937	592873	598144	602284
2	.100	8.53	9.00	9.16	9.24	9.29	9.33	9.35	9.37	9.38
	.050	18.51	19.00	19.16	19.25	19.30	19.33	19.35	19.37	19.38
	.025	38.51	39.00	39.17	39.25	39.30	39.33	39.36	39.37	39.39
	.010	98.50	99.00	99.17	99.25	99.30	99.33	99.36	99.37	99.39
	.001	998.50	999.00	999.17	999.25	999.30	999.33	999.36	999.37	999.39
3	.100	5.54	5.46	5.39	5.34	5.31	5.28	5.27	5.25	5.24
	.050	10.13	9.55	9.28	9.12	9.01	8.94	8.89	8.85	8.81
	.025	17.44	16.04	15.44	15.10	14.88	14.73	14.62	14.54	14.47
	.010	34.12	30.82	29.46	28.71	28.24	27.91	27.67	27.49	27.35
	.001	167.03	148.50	141.11	137.10	134.58	132.85	131.58	130.62	129.86
4	.100	4.54	4.32	4.19	4.11	4.05	4.01	3.98	3.95	3.94
	.050	7.71	6.94	6.59	6.39	6.26	6.16	6.09	6.04	6.00
	.025	12.22	10.65	9.98	9.60	9.36	9.20	9.07	8.98	8.90
	.010	21.20	18.00	16.69	15.98	15.52	15.21	14.98	14.80	14.66
	.001	74.14	61.25	56.18	53.44	51.71	50.53	49.66	49.00	48.47
5	.100	4.06	3.78	3.62	3.52	3.45	3.40	3.37	3.34	3.32
	.050	6.61	5.79	5.41	5.19	5.05	4.95	4.88	4.82	4.77
	.025	10.01	8.43	7.76	7.39	7.15	6.98	6.85	6.76	6.68
	.010	16.26	13.27	12.06	11.39	10.97	10.67	10.46	10.29	10.16
	.001	47.18	37.12	33.20	31.09	29.75	28.83	28.16	27.65	27.24
6	.100	3.78	3.46	3.29	3.18	3.11	3.05	3.01	2.98	2.96
	.050	5.99	5.14	4.76	4.53	4.39	4.28	4.21	4.15	4.10
	.025	8.81	7.26	6.60	6.23	5.99	5.82	5.70	5.60	5.52
	.010	13.75	10.92	9.78	9.15	8.75	8.47	8.26	8.10	7.98
	.001	35.51	27.00	23.70	21.92	20.80	20.03	19.46	19.03	18.69
7	.100	3.59	3.26	3.07	2.96	2.88	2.83	2.78	2.75	2.72
	.050	5.59	4.74	4.35	4.12	3.97	3.87	3.79	3.73	3.68
	.025	8.07	6.54	5.89	5.52	5.29	5.12	4.99	4.90	4.82
	.010	12.25	9.55	8.45	7.85	7.46	7.19	6.99	6.84	6.72
	.001	29.25	21.69	18.77	17.20	16.21	15.52	15.02	14.63	14.33

### Valores críticos de la distribución ji cuadrada

		$\chi^2$																
		0,001	0,005	0,01	0,02	0,025	0,03	0,04	0,05	0,10	0,15	0,20	0,25	0,30	0,35	0,40		
g.d.l.																	g.d.l.	
1		10,828	7,879	6,635	5,412	5,024	4,709	4,218	3,841	2,706	2,072	1,642	1,323	1,074	0,873	0,708	1	
2		13,816	10,597	9,210	7,824	7,378	7,013	6,438	5,991	4,605	3,794	3,219	2,773	2,408	2,100	1,833	2	
3		16,266	12,838	11,345	9,837	9,348	8,947	8,311	7,815	6,251	5,317	4,642	4,108	3,665	3,283	2,946	3	
4		18,467	14,860	13,277	11,668	11,143	10,712	10,026	9,488	7,779	6,745	5,989	5,385	4,878	4,438	4,045	4	
5		20,515	16,750	15,086	13,388	12,833	12,375	11,644	11,070	9,236	8,115	7,289	6,626	6,064	5,573	5,132	5	
6		22,458	18,548	16,812	15,033	14,449	13,968	13,198	12,592	10,445	9,446	8,558	7,841	7,231	6,695	6,211	6	
7		24,322	20,278	18,475	16,622	16,013	15,509	14,703	14,067	11,617	10,645	9,803	9,037	8,383	7,806	7,283	7	
8		26,124	21,955	20,090	18,168	17,535	17,010	16,171	15,507	13,362	12,027	11,030	10,219	9,524	8,909	8,351	8	
9		27,877	23,589	21,666	19,679	19,023	18,480	17,608	16,919	14,684	13,288	12,242	11,389	10,656	10,006	9,414	9	
10		29,588	25,188	23,209	21,161	20,483	19,922	19,021	18,307	15,987	14,534	13,442	12,549	11,781	11,097	10,473	10	
11		31,264	26,757	24,725	22,618	21,920	21,342	20,412	19,675	17,275	15,767	14,631	13,701	12,899	12,184	11,530	11	
12		32,909	28,300	26,217	24,054	23,337	22,742	21,785	21,026	18,549	16,989	15,812	14,845	14,011	13,266	12,584	12	
13		34,528	29,819	27,688	25,472	24,736	24,125	23,142	22,362	19,812	18,202	16,985	15,984	15,119	14,345	13,636	13	
14		36,123	31,319	29,141	26,873	26,119	25,493	24,485	23,685	21,064	19,406	18,151	17,117	16,222	15,421	14,685	14	
15		37,697	32,801	30,578	28,259	27,488	26,848	25,816	24,996	22,307	20,603	19,311	18,245	17,322	16,494	15,733	15	
16		39,252	34,267	32,000	29,633	28,845	28,191	27,136	26,296	23,542	21,793	20,465	19,369	18,418	17,565	16,780	16	
17		40,790	35,718	33,409	30,995	30,191	29,523	28,445	27,587	24,769	22,977	21,615	20,489	19,511	18,633	17,824	17	
18		42,312	37,156	34,805	32,346	31,526	30,845	29,745	28,869	25,989	24,155	22,760	21,605	20,601	19,699	18,868	18	
19		43,820	38,582	36,191	33,687	32,852	32,158	31,037	30,144	27,204	25,329	23,900	22,718	21,689	20,764	19,910	19	
20		45,315	39,997	37,566	35,020	34,170	33,462	32,321	31,410	28,412	26,498	25,038	23,828	22,775	21,826	20,951	20	
21		46,797	41,401	38,932	36,343	35,479	34,759	33,597	32,671	29,615	27,662	26,171	24,935	23,858	22,888	21,991	21	
22		48,268	42,796	40,289	37,659	36,781	36,049	34,867	33,924	30,813	28,822	27,301	26,039	24,939	23,947	23,031	22	
23		49,728	44,181	41,638	38,968	38,076	37,332	36,131	35,172	32,007	29,979	28,429	27,141	26,018	25,006	24,069	23	
24		51,179	45,559	42,980	40,270	39,364	38,609	37,389	36,415	33,196	31,132	29,553	28,241	27,096	26,063	25,106	24	
25		52,620	46,928	44,314	41,566	40,646	39,880	38,642	37,652	34,382	32,282	30,675	29,339	28,172	27,118	26,143	25	
26		54,052	48,290	45,642	42,856	41,923	41,146	39,889	38,885	35,563	33,429	31,795	30,435	29,246	28,173	27,179	26	
27		55,476	49,645	46,963	44,140	43,195	42,407	41,132	40,113	36,741	34,574	32,912	31,528	30,319	29,227	28,214	27	
28		56,892	50,993	48,278	45,419	44,461	43,662	42,370	41,337	37,916	35,715	34,027	32,620	31,391	30,279	29,249	28	
29		58,301	52,336	49,588	46,693	45,722	44,913	43,604	42,557	39,087	36,854	35,139	33,711	32,461	31,331	30,283	29	
30		59,703	53,672	50,892	47,962	46,979	46,160	44,834	43,773	40,256	38,000	36,250	34,800	33,330	32,382	31,316	30	
31		61,098	55,003	52,191	49,226	48,232	47,402	46,059	44,985	41,422	39,124	37,359	35,887	34,598	33,431	32,349	31	
32		62,487	56,328	53,486	50,487	49,480	48,641	47,282	46,194	42,585	40,256	38,466	36,973	35,665	34,480	33,381	32	
33		63,870	57,648	54,776	51,743	50,725	49,876	48,500	47,400	43,745	41,386	39,572	38,058	36,731	35,529	34,423	33	
34		65,247	58,964	56,061	52,995	51,966	51,107	49,716	48,602	44,903	42,514	40,676	39,141	37,795	36,576	35,444	34	
35		66,619	60,275	57,342	54,244	53,203	52,335	50,928	49,802	46,059	43,640	41,778	40,223	38,859	37,623	36,475	35	
40		73,402	66,766	63,691	60,436	59,342	58,228	56,946	55,758	51,805	49,244	47,269	45,616	44,165	42,848	41,622	40	
60		99,607	91,952	88,379	84,580	83,298	82,225	80,482	79,082	74,397	71,341	68,972	66,981	65,227	63,628	62,135	60	
80		124,839	116,321	112,329	108,669	106,629	105,422	103,459	101,879	96,578	93,106	90,405	88,130	86,120	84,284	82,566	80	
90		137,208	128,299	124,116	119,648	118,136	116,869	114,806	113,145	107,565	103,904	101,054	98,650	96,524	94,581	92,761	90	
100		149,449	140,169	135,807	131,142	129,561	128,237	126,079	124,342	118,498	114,659	111,667	109,141	106,906	104,862	102,946	100	
120		173,617	163,648	158,500	153,918	152,211	150,780	148,447	146,567	140,233	136,062	132,806	130,055	127,616	125,383	123,289	120	
140		197,511	186,847	181,840	176,471	174,648	173,118	170,624	168,613	161,827	157,352	153,854	150,894	148,269	145,863	143,604	140	
g.d.l.		0,45	0,50	0,55	0,60	0,65	0,70	0,75	0,80	0,85	0,90	0,95	0,975	0,98	0,99	0,995	g.d.l.	
1		0,571	0,455	0,357	0,275	0,206	0,148	0,102	0,064	0,036	0,016	0,004	0,001	0,001	0,000	0,000	1	
2		1,597	1,386	1,196	1,022	0,862	0,713	0,575	0,446	0,325	0,211	0,103	0,051	0,040	0,020	0,010	2	
3		2,643	2,366	2,109	1,869	1,642	1,424	1,213	1,005	0,798	0,584	0,352	0,216	0,185	0,115	0,072	3	
4		3,687	3,357	3,047	2,753	2,470	2,195	1,923	1,649	1,366	1,064	0,711	0,484	0,429	0,297	0,207	4	
5		4,728	4,351	3,996	3,655	3,325	3,000	2,675	2,343	1,994	1,610	1,145	0,831	0,752	0,554	0,412	5	
6		5,765	5,348	4,952	4,570	4,197	3,828	3,455	3,070	2,661	2,204	1,635	1,237	1,134	0,872	0,676	6	
7		6,800	6,346	5,913	5,493	5,082	4,671	4,255	3,822	3,358	2,833	2,167	1,690	1,564	1,239	0,989	7	
8		7,833	7,344	6,877	6,423	5,975	5,527	5,071	4,594	4,078	3,490	2,733	2,180	2,032	1,644	1,344	8	
9		8,863	8,343	7,843	7,357	6,876	6,393	5,899	5,380	4,817	4,168	3,325	2,700	2,532	2,088	1,735	9	
10		9,892	9,342	8,812	8,295	7,783	7,267	6,737	6,179	5,570	4,865	3,940	3,247	3,059	2,558	2,156	10	
11		10,920	10,341	9,783	9,237	8,695	8,148	7,584	6,989	6,336	5,578	4,575	3,816	3,609	3,053	2,603	11	
12		11,946	11,340	10,755	10,182	9,612	9,034	8,438	7,807	7,114	6,304	5,226	4,404	4,178	3,571	3,074	12	
13		12,972	12,340	11,729	11,129	10,532	9,926	9,298	8,634	7,901	7,042	5,892	5,059	4,765	4,107	3,565	13	
14		13,996	13,339	12,703	12,078	11,455	10,821	10,165	9,467	8,696	7,790	6,571	5,629	5,366	4,660	4,075	14	
15		15,020	14,339	13,679	13,030	12,381	11,721	11,037	10,307	9,499	8,547	7,261	6,262	5,985	5,229	4,601	15	
16		16,042	15,338	14,655	13,983	13,310	12,624	11,912	11,152	10,309	9,312	7,962	6,908	6,614	5,812	5,142	16	
17		17,065	16,338	15,633	14,937	14,241	13,531	12,792	12,002	11,125	10,085	8,672	7,564	7,255	6,408	5,697	17	
18		18,086	17,338	16,611	15,893	15,174	14,440	13,675	12,857	11,946	10,865	9,390	8,231	7,906	7,015	6,265	18	
19		19,107	18,338	17,589	16,850	16,109	15,352	14,562	13,716	12,773	11,651	10,117	8,907	8,567	7,633	6,844	19	
20		20,127	19,337	18,569	17,809	17,046	16,266	15,452	14,578	13,604	12,443	10,851	9,591	9,237	8,260	7,434	20	
21		21,147	20,337	19,548	18,768	17,984	17,182	16,344	15,445	14,439	13,240	11,591	10,283	9,915	8,897	8,034	21	
22		22,166	21,337	20,5														

**TABLA DE LA DISTRIBUCION  $t$ -Student con  $n$  grados de libertad..**



$1 - \alpha$

$n$	0.75	0.80	0.85	0.90	0.95	0.975	0.99	0.995
1	1.000	1.376	1.963	3.078	6.314	12.706	31.821	63.657
2	0.816	1.061	1.386	1.886	2.920	4.303	6.965	9.925
3	0.765	0.978	1.250	1.638	2.353	3.182	4.541	5.841
4	0.741	0.941	1.190	1.533	2.132	2.776	3.747	4.604
5	0.727	0.920	1.156	1.476	2.015	2.571	3.365	4.032
6	0.718	0.906	1.134	1.440	1.943	2.447	3.143	3.707
7	0.711	0.896	1.119	1.415	1.895	2.365	2.998	3.499
8	0.706	0.889	1.108	1.397	1.860	2.306	2.896	3.355
9	0.703	0.883	1.100	1.383	1.833	2.262	2.821	3.250
10	0.700	0.879	1.093	1.372	1.812	2.228	2.764	3.169
11	0.697	0.876	1.088	1.363	1.796	2.201	2.718	3.106
12	0.695	0.873	1.083	1.356	1.782	2.179	2.681	3.055
13	0.694	0.870	1.079	1.350	1.771	2.160	2.650	3.012
14	0.692	0.868	1.076	1.345	1.761	2.145	2.624	2.977
15	0.691	0.866	1.074	1.341	1.753	2.131	2.602	2.947
16	0.690	0.865	1.071	1.337	1.746	2.120	2.583	2.921
17	0.689	0.863	1.069	1.333	1.740	2.110	2.567	2.898
18	0.688	0.862	1.067	1.330	1.734	2.101	2.552	2.878
19	0.688	0.861	1.066	1.328	1.729	2.093	2.539	2.861
20	0.687	0.860	1.064	1.325	1.725	2.086	2.528	2.845
21	0.686	0.859	1.063	1.323	1.721	2.080	2.518	2.831
22	0.686	0.858	1.061	1.321	1.717	2.074	2.508	2.819
23	0.685	0.858	1.060	1.319	1.714	2.069	2.500	2.807
24	0.685	0.857	1.059	1.318	1.711	2.064	2.492	2.797
25	0.684	0.856	1.058	1.316	1.708	2.060	2.485	2.787
26	0.684	0.856	1.058	1.315	1.706	2.056	2.479	2.779
27	0.684	0.855	1.057	1.314	1.703	2.052	2.473	2.771
28	0.683	0.855	1.056	1.313	1.701	2.048	2.467	2.763
29	0.683	0.854	1.055	1.311	1.699	2.045	2.462	2.756
30	0.683	0.854	1.055	1.310	1.697	2.042	2.457	2.750
40	0.681	0.851	1.050	1.303	1.684	2.021	2.423	2.704
60	0.679	0.848	1.046	1.296	1.671	2.000	2.390	2.660
120	0.677	0.845	1.041	1.289	1.658	1.980	2.358	2.617
∞	0.674	0.842	1.036	1.282	1.645	1.960	2.326	2.576



ESTADÍSTICO DEL RANGO ESTANDARIZADO (TUKEY)

		Número de condiciones de la variable independiente													
$g_{L_{\alpha}}$	$\alpha$	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
1	0,050	17,970	36,980	32,820	37,080	40,410	43,120	45,400	47,360	49,070	50,600	52,000	53,200	54,300	
	0,010	90,030	135,000	164,300	185,600	202,200	215,800	227,200	237,000	245,600	253,000	260,000	266,000	272,000	
2	0,050	6,085	8,331	9,798	10,880	11,732	12,436	13,026	13,539	13,989	14,392	14,746	15,071	15,370	
	0,010	14,040	19,020	22,290	24,720	26,630	28,200	29,530	30,680	31,690	32,590	33,440	34,110	34,820	
3	0,050	4,501	5,910	6,825	7,502	8,037	8,478	8,853	9,177	9,462	9,714	9,941	10,149	10,340	
	0,010	8,261	10,620	12,170	13,330	14,240	15,000	15,640	16,200	16,690	17,130	17,510	17,860	18,190	
4	0,050	3,927	5,040	5,757	6,287	6,707	7,053	7,347	7,602	7,826	8,026	8,208	8,371	8,522	
	0,010	6,512	8,120	9,173	9,958	10,584	11,097	11,542	11,928	12,268	12,579	12,837	13,082	13,314	
5	0,050	3,635	4,602	5,218	5,673	6,033	6,330	6,582	6,802	6,995	7,167	7,322	7,464	7,594	
	0,010	5,702	6,976	7,804	8,421	8,913	9,321	9,669	9,972	10,242	10,487	10,694	10,892	11,074	
6	0,050	3,461	4,339	4,896	5,305	5,628	5,895	6,122	6,319	6,493	6,648	6,788	6,915	7,033	
	0,010	5,243	6,331	7,033	7,556	7,973	8,318	8,613	8,869	9,097	9,307	9,481	9,650	9,805	
7	0,050	3,344	4,165	4,681	5,060	5,359	5,606	5,815	5,998	6,158	6,301	6,431	6,549	6,657	
	0,010	4,949	5,919	6,543	7,005	7,373	7,679	7,939	8,166	8,368	8,552	8,707	8,856	8,994	
8	0,050	3,261	4,041	4,529	4,886	5,167	5,399	5,597	5,767	5,918	6,053	6,175	6,286	6,388	
	0,010	4,746	5,635	6,204	6,625	6,960	7,237	7,474	7,681	7,863	8,030	8,172	8,308	8,432	
9	0,050	3,199	3,949	4,415	4,756	5,024	5,244	5,432	5,595	5,739	5,866	5,983	6,088	6,185	
	0,010	4,596	5,428	5,957	6,348	6,658	6,915	7,134	7,325	7,495	7,648	7,781	7,906	8,021	
10	0,050	3,151	3,877	4,327	4,654	4,912	5,124	5,305	5,461	5,599	5,721	5,833	5,934	6,027	
	0,010	4,482	5,270	5,769	6,136	6,428	6,669	6,875	7,055	7,213	7,357	7,482	7,599	7,708	
11	0,050	3,113	3,820	4,256	4,574	4,823	5,028	5,202	5,353	5,487	5,605	5,713	5,811	5,901	
	0,010	4,392	5,146	5,621	5,970	6,247	6,476	6,672	6,842	6,992	7,129	7,247	7,359	7,461	
12	0,050	3,082	3,773	4,199	4,508	4,751	4,950	5,119	5,265	5,395	5,510	5,614	5,710	5,797	
	0,010	4,320	5,046	5,502	5,836	6,101	6,321	6,507	6,670	6,814	6,944	7,057	7,164	7,262	
13	0,050	3,055	3,735	4,151	4,453	4,690	4,885	5,049	5,192	5,318	5,431	5,532	5,625	5,710	
	0,010	4,260	4,964	5,404	5,727	5,981	6,192	6,372	6,528	6,667	6,791	6,901	7,004	7,098	
14	0,050	3,033	3,702	4,111	4,407	4,639	4,829	4,990	5,131	5,254	5,363	5,463	5,553	5,637	
	0,010	4,210	4,895	5,322	5,634	5,881	6,085	6,258	6,409	6,543	6,664	6,770	6,869	6,960	
15	0,050	3,014	3,674	4,076	4,367	4,595	4,782	4,940	5,077	5,198	5,306	5,403	5,492	5,574	
	0,010	4,168	4,836	5,252	5,556	5,796	5,994	6,162	6,309	6,439	6,555	6,658	6,754	6,843	
16	0,050	2,998	3,649	4,046	4,333	4,557	4,741	4,897	5,031	5,150	5,256	5,351	5,439	5,519	
	0,010	4,131	4,786	5,192	5,489	5,722	5,915	6,079	6,222	6,348	6,462	6,563	6,655	6,742	
17	0,050	2,984	3,628	4,020	4,303	4,524	4,705	4,858	4,991	5,108	5,212	5,306	5,392	5,471	
	0,010	4,099	4,742	5,140	5,430	5,659	5,847	6,007	6,147	6,270	6,381	6,480	6,570	6,654	
18	0,050	2,971	3,609	3,997	4,277	4,495	4,673	4,824	4,956	5,071	5,173	5,266	5,351	5,428	
	0,010	4,071	4,703	5,094	5,379	5,603	5,788	5,944	6,081	6,201	6,310	6,406	6,494	6,577	
19	0,050	2,960	3,593	3,977	4,253	4,469	4,645	4,794	4,924	5,038	5,139	5,230	5,314	5,391	
	0,010	4,046	4,670	5,054	5,334	5,554	5,735	5,889	6,022	6,141	6,247	6,341	6,428	6,508	
20	0,050	2,950	3,578	3,958	4,232	4,445	4,620	4,768	4,896	5,008	5,108	5,199	5,281	5,357	
	0,010	4,024	4,639	5,018	5,294	5,510	5,688	5,839	5,970	6,087	6,190	6,284	6,368	6,447	
24	0,050	2,919	3,532	3,901	4,166	4,373	4,541	4,684	4,807	4,915	5,011	5,099	5,178	5,251	
	0,010	3,956	4,546	4,907	5,168	5,374	5,542	5,685	5,809	5,919	6,017	6,105	6,186	6,259	
30	0,050	2,888	3,486	3,845	4,102	4,302	4,464	4,602	4,720	4,824	4,917	5,000	5,077	5,146	
	0,010	3,889	4,455	4,799	5,048	5,242	5,401	5,536	5,653	5,756	5,848	5,931	6,007	6,077	
40	0,050	2,858	3,442	3,791	4,039	4,232	4,389	4,521	4,635	4,735	4,824	4,904	4,976	5,043	
	0,010	3,825	4,367	4,696	4,931	5,114	5,265	5,392	5,502	5,599	5,685	5,763	5,835	5,900	
60	0,050	2,829	3,399	3,737	3,977	4,163	4,314	4,441	4,550	4,646	4,731	4,808	4,878	4,942	
	0,010	3,762	4,282	4,595	4,818	4,991	5,133	5,253	5,356	5,447	5,527	5,600	5,667	5,728	
80	0,050	2,814	3,377	3,711	3,947	4,129	4,277	4,401	4,509	4,603	4,686	4,761	4,829	4,892	
	0,010	3,732	4,241	4,545	4,763	4,932	5,069	5,183	5,283	5,371	5,450	5,521	5,585	5,644	
100	0,050	2,806	3,364	3,695	3,929	4,109	4,255	4,378	4,484	4,577	4,659	4,733	4,800	4,862	
	0,010	3,714	4,216	4,516	4,730	4,896	5,031	5,143	5,241	5,328	5,404	5,474	5,536	5,594	
120	0,050	2,800	3,356	3,684	3,917	4,096	4,241	4,363	4,467	4,559	4,641	4,714	4,781	4,842	
	0,010	3,702	4,200	4,497	4,709	4,872	5,005	5,118	5,214	5,299	5,374	5,442	5,504	5,561	
1000	0,050	2,771	3,313	3,632	3,857	4,029	4,169	4,285	4,386	4,473	4,551	4,621	4,684	4,742	
	0,010	3,638	4,116	4,399	4,599	4,753	4,879	4,984	5,074	5,153	5,223	5,287	5,344	5,397	
$\infty$	0,050	2,772	3,314	3,633	3,858	4,030	4,170	4,286	4,387	4,474	4,552	4,622	4,685	4,743	
	0,010	3,643	4,120	4,403	4,603	4,757	4,882	4,987	5,078	5,157	5,227	5,291	5,348	5,401	

**PRUEBA DE DUNNETT**

$g^L_{error}$	$\alpha$	Número de condiciones de la variable independiente								
		2	3	4	5	6	7	8	9	10
5	0,050	2,57	3,03	3,29	3,48	3,62	3,73	3,82	3,900	3,970
	0,010	4,03	4,63	4,98	5,22	5,41	5,56	5,69	5,800	5,890
6	0,050	2,45	2,86	3,10	3,26	3,39	3,49	3,57	3,640	3,710
	0,010	3,71	4,21	4,51	4,71	4,87	5,00	5,10	5,200	5,280
7	0,050	2,36	2,75	2,97	3,12	3,24	3,33	3,41	3,470	3,530
	0,010	3,50	3,95	4,21	4,39	4,53	4,64	4,74	4,820	4,890
8	0,050	2,31	2,67	2,88	3,02	3,13	3,22	3,29	3,350	3,410
	0,010	3,36	3,77	4,00	4,17	4,29	4,40	4,48	4,560	4,620
9	0,050	2,26	2,61	2,81	2,95	3,05	3,14	3,20	3,260	3,320
	0,010	3,25	3,63	3,85	4,01	4,12	4,22	4,30	4,370	4,430
10	0,050	2,23	2,57	2,76	2,89	2,99	3,07	3,14	3,190	3,240
	0,010	3,17	3,53	3,74	3,88	3,99	4,08	4,16	4,220	4,280
11	0,050	2,20	2,53	2,72	2,84	2,94	3,02	3,08	3,140	3,190
	0,010	3,11	3,45	3,65	3,79	3,89	3,98	4,05	4,110	4,160
12	0,050	2,18	2,50	2,68	2,81	2,90	2,98	3,04	3,090	3,140
	0,010	3,05	3,39	3,58	3,71	3,81	3,89	3,96	4,020	4,070
13	0,050	2,16	2,48	2,65	2,78	2,87	2,94	3,00	3,060	3,100
	0,010	3,01	3,33	3,52	3,65	3,74	3,82	3,89	3,940	3,990
14	0,050	2,14	2,46	2,63	2,75	2,84	2,91	2,97	3,020	3,070
	0,010	2,98	3,29	3,47	3,59	3,69	3,76	3,83	3,880	3,930
15	0,050	2,13	2,44	2,61	2,73	2,82	2,89	2,95	3,000	3,040
	0,010	2,95	3,25	3,43	3,55	3,64	3,71	3,78	3,830	3,880
16	0,050	2,12	2,42	2,59	2,71	2,80	2,87	2,92	2,970	3,020
	0,010	2,92	3,22	3,39	3,51	3,60	3,67	3,73	3,780	3,830
17	0,050	2,11	2,41	2,58	2,69	2,78	2,85	2,90	2,950	3,000
	0,010	2,90	3,19	3,36	3,47	3,56	3,63	3,69	3,740	3,790
18	0,050	2,10	2,40	2,56	2,68	2,76	2,83	2,89	2,940	2,980
	0,010	2,88	3,17	3,33	3,44	3,53	3,60	3,66	3,710	3,750
19	0,050	2,09	2,39	2,55	2,66	2,75	2,81	2,87	2,920	2,960
	0,010	2,86	3,15	3,31	3,42	3,50	3,57	3,63	3,680	3,720
20	0,050	2,09	2,38	2,54	2,65	2,73	2,80	2,86	2,900	2,950
	0,010	2,85	3,13	3,29	3,40	3,48	3,55	3,60	3,650	3,690
24	0,050	2,06	2,35	2,51	2,61	2,70	2,76	2,81	2,860	2,900
	0,010	2,80	3,07	3,22	3,32	3,40	3,47	3,52	3,570	3,610
30	0,050	2,04	2,32	2,47	2,58	2,66	2,72	2,77	2,820	2,860
	0,010	2,75	3,01	3,15	3,25	3,33	3,39	3,44	3,490	3,520
40	0,050	2,02	2,29	2,44	2,54	2,62	2,68	2,73	2,770	2,810
	0,010	2,70	2,95	3,09	3,19	3,26	3,32	3,37	3,410	3,440
60	0,050	2,00	2,27	2,41	2,51	2,58	2,64	2,69	2,730	2,770
	0,010	2,66	2,90	3,03	3,12	3,19	3,25	3,29	3,330	3,370
120	0,050	1,98	2,24	2,38	2,47	2,55	2,60	2,65	2,690	2,730
	0,010	2,62	2,85	2,97	3,06	3,12	3,18	3,22	3,260	3,290
$\infty$	0,050	1,96	2,21	2,35	2,44	2,51	2,57	2,61	2,650	2,690
	0,010	2,58	2,79	2,92	3,00	3,06	3,11	3,15	3,190	3,220

### Índice de formulas

No.	Descripción	Página
1	$S_r$ o $S_R$ a partir de la desviación estándar de n mediciones	7
2	Desviación estándar a partir de p grupos de mediciones	8
3	Varianza de la repetibilidad	8
4	Varianza interlaboratorio	9
5	Varianza dentro del laboratorio	9
6	n promedio (número de mediciones promedio)	9
7	Varianza de la reproducibilidad	9
8	Varianza de la repetibilidad para n=2	9
9	Varianza interlaboratorio para n=2	9
10	Varianza de la repetibilidad usando hoja de cálculo en Excel	10
11	Varianza interlaboratorio usando hoja de cálculo en Excel	10
12	Desviación estándar de la repetibilidad	10
13	Desviación estándar de la reproducibilidad	10
14	Suma de cuadrados entre grupos o tratamientos	12
15	Suma de cuadrados total	12
16	Suma de cuadrados intragrupos o individuos	12
17	N total (suma de $n_i$ )	13
18	Promedio de los rangos de las celdas	14
19	Desviación estándar de las celdas	14
20	Promedio de promedios (gran media)	15
21	Rango de celdas	15
22	Desviación estándar de los promedios de las celdas	15, 32
23	Desviación estándar de la repetibilidad a partir de rangos	15
24	Desviación estándar de la reproducibilidad a partir de rangos	16
25	Límite de la repetibilidad	16
26	Límite de la reproducibilidad	16
27	Estadístico $j_i$ cuadrada para comparación de varianzas	17
28	Límite inferior del intervalo de confianza en varianzas	18
29	Límite superior del intervalo de confianza en varianzas	18
30	Relación F de Fisher para comparación de varianzas	18, 38, 86
31	Valor Horrat	19
32	Ecuación de Horwitz	19
33	Promedio o media	33
34	Sesgo de un método	33
35	Sesgo de un laboratorio	34

36	Variación (desviación estándar) del estimado del sesgo	34
37	Recuperación (adición en matriz libre del analito)	35
38	Recuperación (adición en matriz que contiene el analito)	35
39	Determinación de la incertidumbre por el sesgo	36
40	Determinación de la incertidumbre por desviación estándar	36
41	Intervalo de confianza del sesgo	36
42	Función $A_w$ para una pendiente con n mediciones	37
43	Prueba t: comparación con MR de incertidumbre significativa	37
44	Prueba t: comparación con MR de incertidumbre no significativa	38
45	Diferencia crítica (CD) del sesgo	39
46	Comparación del sesgo con métodos de referencia de precisión conocida	39
47	Prueba t: comparación de medias de varianza similar	41
48	Prueba t: comparación de medias de varianza diferente	41
49	Aproximación de Welch-Satterthwaite para determinar grados de libertad	41
50	Prueba t para evaluar recuperación	42
51	Prueba t: comparación de muestras pareadas	44
52	Promedio de residuos $s_{x/y}$	45
53	Desviación estándar de la pendiente de una recta	46
54	Desviación estándar de la ordenada al origen de una recta	46
55	Calculo de la pendiente de una recta (función de una línea recta)	47
56	Calculo de la ordenada al origen de una recta	47
57	Prueba t: comparación de pendiente diferente de 1	47
58	Prueba t: comparación de la ordenada al origen diferente de 0	47
59	Ecuación para una línea recta	53
60	Calculo del coeficiente de correlación "r"	56
61	Prueba t: comparación del coeficiente r contra con r=1	57
62	Determinación de factor de respuesta $f_i$	58
63	Factor de respuesta promedio de n mediciones	58
64	Coefficiente de variación del factor de respuesta	58
65	Límite de detección: criterio 3s para blancos de lectura $\neq 0$	70
66	Límite de detección: criterio 3s para blancos de lectura = 0	70
67	Límite de detección: criterio $\alpha=\beta=5\%$	72
68	Límite de detección: criterio $\alpha=\beta=5\%$ redondeado	73
69	Límite de detección: Producto de la desviación estándar por la pendiente	73
70	Límite de cuantificación: Producto de la desviación estándar por la pendiente	81

71	Límite de cuantificación: desviación estándar de blancos de lectura $\neq 0$	81
72	Prueba F: para comparación de pendientes de la recta	92
73	Sumatoria de desviaciones $s_{xx}$	92
74	Diferencia mínima significativa (LSD o DSM)	96
75	Determinación de DSM para diferente número de mediciones n	97
76	Determinación de $T\alpha$ para prueba de Tukey, $n_1=n_2=\dots=n_i$	97
77	Determinación de $T\alpha$ para prueba de Tukey, $n_1\neq n_2\neq\dots\neq n_i$	98
78	Determinación de "d'" para prueba de Dunnett	98
79	Calculo del efecto de las variables en pruebas de robustez $D_t$	104
80	Prueba t: comparación del efecto de una variable	105
81	Sensibilidad "S"	115
82	Sensibilidad analítica " $\gamma$ "	116
83	Determinación del ruido instrumental	117
84	Desviación estándar de los residuos de una regresión lineal	117
85	Prueba t : comparación de pendientes utilizando el error de la pendiente	119
86	Suma de cuadrados del error SCE	85, 119
87	Desviación estándar del error $s_{xx}$	120
88	Prueba F: para comparación de pendientes	120



### Índice de figuras

No.	Descripción	Página
1	Graficas de valores esperados contra valores obtenidos	45
2	Intervalo lineal e intervalo de medición	52
3	Gráficos de residuos	59
4	Distribución de valores alrededor del cero	69
5	Límite de decisión y límite de detección	71
6	Definición de sensibilidad como pendiente	114
7	Comparación visual de rectas	117
8	Efecto sustractivo de la interferencia sobre la concentración	131

### Índice de Tablas

No.	Descripción	Página
1	Hoja de cálculo en Excel para determinación de la precisión intermedia.	11
2	Arreglo de datos para análisis por Anova	13
3	Tabla Anova para cálculo de precisión intermedia	14
4	Recuperación aceptable en función de la concentración	43
5	Arreglo de datos para análisis de muestras pareadas	44
6	Tabla Anova	94
7	Diseño de experimentos 2x2	99
8	Diseño de experimentos 2x3	100
9	Diseño de experimentos 2x4	100 y 101
10	Análisis de un diseño 2x2 por F de Fisher y valor p	101
11	Experimento Plackett-Burman para 8 variables	103
12	Arreglo Plackett-Burman para menos de 8 variables	103
13	Cálculo para la prueba de diferencias entre pendientes	120

## Referencias:

1. An Introduction to Method Validation. Sally L. Hopkins and Vicki Barwick. LGC, Queens Road, Teddington, TW11 0LY 2008 Royal Society of Chemistry.
2. AOAC requirements for single laboratory validation of chemical methods. 2002-11-07 pag.21.
3. ASTM E177 – 13 Standard Practices for Use of the Terms Precision and Bias in ASTM Test Methods.
4. ASTM E 691–14 Standard Practice for Conducting an Interlaboratory Study to Determine the Precision of a Test Method.
5. ASTM E 1169-14 Standard Practice for Conducting Ruggedness Tests
6. Estadística y Quimiometria para Química Analítica. James N. Miller. Jane C. Miller. Prentice Hall. 4a. Edición. Madrid. 2002.
7. Guidelines for the validation and verification of quantitative and qualitative test methods. NATA Technical Note 17 — June 2012 Issued: August 2004 Amended and reissued: December 2006, April 2009, March 2012, June 2012.
8. Gold Book. Compendium of Chemical Terminology. International Union of Pure and Applied Chemistry. Version 2.3.2, 2012-08-19.
9. Harmonized guidelines for single laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report) *Pure Appl. Chem.*, Vol. 74, No. 5, pp. 835–855, 2002. © 2002 IUPAC pág. 13
10. Horrat for SLV (Single Laboratory Validation). AOAC. 2004
11. ICH Harmonised Tripartite Guideline. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1). Current Step 4 version Parent Guideline dated 27 October 1994 (Complementary Guideline on Methodology dated 6 November 1996 incorporated in November 2005).

12. In-House Method Validation. Guide for chemical laboratories. Produced by LGC as part of the DTI VAM programme.2003.
13. JCGM 200:2012 International vocabulary of metrology – Basic and general concepts and associated terms (VIM) 3rd edition.
14. La selectividad en análisis químico. Ricard Boqué Grupo de Quimiometría y Cualimetría Universidad Rovira i Virgili (Tarragona). 2005.
15. Montgomery, D.C. Diseño y Análisis de Experimentos. John Wiley, Limusa. (2007).
16. NMX-CH-5725-1-IMNC-2006 Exactitud (veracidad y precisión) de resultados y métodos de medición - Parte 1: Principios Generales y Definiciones.
17. NMX-CH-5725-2-IMNC-2006 Exactitud (veracidad y precisión) de resultados y métodos de medición - Parte 2: Método básico para la determinación de la repetibilidad y la reproducibilidad de un método normalizado.
18. NMX-CH-5725-3-IMNC-2006 Exactitud (veracidad y precisión) de resultados y métodos de medición - Parte 3: Medidas intermedias de la precisión de un método de medición normalizado.
19. NMX-CH-5725-4-IMNC-2006 Exactitud (veracidad y precisión) de resultados y métodos de medición - Parte 4: Métodos básicos para la determinación de la veracidad de un método de medición normalizado.
20. NMX-CH-5725-6-IMNC-2006 Exactitud (veracidad y precisión) de resultados y métodos de medición - Parte 6: Utilización en la práctica de los valores de exactitud.
21. NMX-EC-17025-2006 (ISO/IEC 17025:2005) Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración.
22. Probabilidad y estadística para ingeniería. William W. Hines. Douglas C. Montgomery. David M. Goldsman, Connie M. Borror. Cuarta edición. Grupo Editorial Patria. 2008.

23. Probabilidad y estadística para ingenieros y ciencias. Ronald E. Walpore, Raymond H. Myers, Sharon L. Myers, Keying Ye. Octava Edición. Pearson. Prentice Hall. México 2007.
24. Propuesta metodológica para comparar el efecto de diferentes coberturas vegetales en la regulación de caudales en cuencas hidrográficas. Aplicación en la microcuenca de la quebrada la murciélago, Nota técnica. Antioquia avances en recursos hidráulicos Número 15, Mayo de 2007, Medellín ISSN 0121 5701
25. Protocolo de Validación de Métodos analíticos cuantitativos. RPS-Qualitas; Junio 2006.
26. PS15 Guide to Method Validation for Quantitative Analysis in Chemical Testing Laboratories. Irish National Accreditation Board. Issue 3 April 2012.
27. Quimiometría. Biblioteca de químicas. Guillermo Ramis Ramos, Ma. Celia García Álvarez-Coque. Editorial Sintesis.España 2001.
28. Regresión lineal en química analítica. Alejandro C. Olivieri. Departamento de Química Analítica, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario, Suipacha 531, Rosario (S2002LRK), Argentina.
29. The Fitness for Purpose of Analytical Methods. A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. Eurachem. Second Edition 2014, December 1998.
30. Trends in Analytical Chemistry, Volume 26, No. 3 2007 A practical guide to Analytical Method Validation, including measurement uncertainty and accuracy profile. A Gustavo González. Ma. Angeles Herrador; Elsevier Ltd.
31. Trends in quality in the analytical laboratory II. Analytical method validation and quality assurance. Isabel Taverniers. Marc De Loose, Erick Van Bockstaele. Vol 23. No. 8 2004.
32. Validation of Analytical Methods By Ricard Boqué, Alicia Maroto, Jordi Riu and F. Xavier Rius. Department of Analytical Chemistry and Organic Chemistry University Rovira i Virgili Pl. Imperial Tàrraco, 1, 43005-Tarragona, Spain. Vol. 53. Fasc. 1 (2002), 128-143.

33. El límite de detección de un método analítico. Ricard Boqué. Grupo de Quimiometría y Cualimetría. Universitat Rovira i Virgili. 2003
  
34. Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: “Aspectos generales sobre la validación de métodos”. Instituto de salud Pública. Santiago de Chile Guía Técnica No. 1, diciembre del 2010.