

La Adecuación al Uso de los Métodos Analíticos

**Una Guía de Laboratorio para Validación de Métodos y
Temas Relacionados**

**Segunda Edición Inglesa
Primera Edición Española**

La Adecuación al Uso de los Métodos Analíticos

Una Guía de Laboratorio para Validación de Métodos y Temas Relacionados

Segunda Edición Inglesa
Primera Edición Española

Agradecimientos

Este documento ha sido elaborado por los miembros del Grupo de Trabajo de Validación de Métodos de Eurachem y otros colaboradores asignados a esta tarea. Han contribuido a esta edición:

Grupo del proyecto

Vicki Barwick	LGC (UK)
Pedro P. Morillas Bravo	Canal de Isabel II Gestión (ES)
Stephen L. R. Ellison	LGC (UK)
Joakim Engman	National Food Agency (SE)
Elin L. F. Gjengedal	Norwegian University of Life Sciences (NO)
Ulla Oxenbøll Lund	Eurofins Miljø A/S (DK)
Bertil Magnusson (editor)	SP Technical Research Institute of Sweden (SE)
Hans-Thomas Müller	Mersin (TR)
Marina Patriarca	Istituto Superiore di Sanità (IT)
Barbara Pohl	Merck KGaA (DE)
Piotr Robouch	European Commission (EU)
Lorens P. Sibbesen (chairman)	Labquality International (DK)
Elvar Theodorsson	University Hospital in Linköping (SE)
Florent Vanstapel	University Hospital Leuven, Leuven (BE)
Isabelle Vercautere	BELAB (BE)
Aysun Yilmaz	Cevre Food and Industrial Analysis Laboratory (TR)
Perihan Yolci Ömeroglu	Okan University (TR)
Ulf Örnemark (editor)	Emendo Dokumentgranskning (SE)

Copyright ©

Los derechos de autor de este documento están en manos de los autores colaboradores. Todas las consultas relativas a la reproducción en cualquier medio, incluida la traducción, deben dirigirse a la secretaría Eurachem. El texto no puede ser copiado para su venta.

Cita recomendada

Esta publicación debe ser citada* como: “B. Magnusson and U. Örnemark (eds.) Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, (2nd ed. 2014). ISBN 978-91-87461-59-0. Available from www.eurachem.org.”

La versión española debe ser citada como: “Eurolab España. P.P. Morillas y colaboradores. Guía Eurachem: La adecuación al uso de los métodos analíticos – Una Guía de laboratorio para la validación de métodos y temas relacionados (1^a ed. 2016). Disponible en www.eurachem.org”

*Sin perjuicio de los requerimientos de revistas

Índice

<i>Prólogo a la primera edición española</i>	1
<i>Prólogo a la segunda edición en inglés</i>	2
<i>Prólogo a la primera edición en inglés</i>	3
<i>Abreviaturas y símbolos</i>	4
1 Introducción	6
1.1 Justificación y alcance de esta Guía	6
1.2 Notas sobre el uso de esta Guía	6
1.2.1 Terminología.....	6
1.2.2 Referencias rápidas.....	7
2 ¿Qué es validar un método?	8
2.1 Definiciones	8
2.2 ¿Cuál es la diferencia entre validación y verificación?	8
3 ¿Por qué es necesario validar un método?	10
3.1 Importancia de la medición analítica	10
3.2 El deber profesional del químico analítico	10
3.3 Desarrollo de métodos	10
4 ¿Cuándo debe validarse o verificarse un método?	12
4.1 Validación de un método	12
4.2 Verificación de un método	12
5 ¿Cómo debe validarse un método?	13
5.1 ¿Quién debe validar un método?	13
5.1.1 Estrategias para validar un método.....	13
5.1.2 Resultados interlaboratorios.....	13
5.1.3 A partir de datos individuales del laboratorio.....	13
5.2 Extensión de los estudios de validación	13
5.3 Plan e informe de validación	14
5.4 Herramientas de validación	15
5.4.1 Blancos.....	15
5.4.2 Muestras de rutina.....	15
5.4.3 Soluciones/material fortificado.....	15
5.4.4 Materiales pre-adicionados.....	15
5.4.5 Patrones de medida.....	15
5.4.6 Estadística.....	16
5.5 Requisitos de validación	16
5.6 Proceso de validación de métodos	16
6 Características de desempeño de los métodos	19
6.1 Selectividad	19
6.1.1 Términos y definiciones.....	19
6.1.2 Efectos de las interferencias.....	19
6.1.3 Evaluación de la selectividad.....	19
6.2 Límite de detección y límite de cuantificación	20
6.2.1 Términos y definiciones.....	20
6.2.2 Determinación de la desviación estándar a niveles bajos.....	21

6.2.3	Estimación del LOD.....	24
6.2.4	Estimación del LOQ.....	24
6.2.5	Procedimientos alternativos	25
6.2.6	Capacidad de detección para un análisis cualitativo	26
6.3	Intervalo de trabajo.....	27
6.3.1	Definición.....	27
6.3.2	Consideraciones para el estudio de validación.....	27
6.3.3	Intervalo de trabajo del método y del instrumento	27
6.3.4	Evaluación del intervalo de trabajo del instrumento	27
6.3.5	Evaluación del intervalo de trabajo del método	28
6.4	Sensibilidad analítica	30
6.4.1	Definición.....	30
6.4.2	Aplicaciones.....	30
6.5	Veracidad	30
6.5.1	Terminología para describir la calidad de medición	30
6.5.2	Determinación del sesgo	31
6.5.3	Interpretación de las mediciones de sesgo.....	34
6.6	Precisión	35
6.6.1	Repetición	35
6.6.2	Condiciones de precisión	35
6.6.3	Límites de precisión	36
6.6.4	Determinación simultánea de la repetibilidad y la precisión intermedia.....	36
6.7	Incertidumbre de medida	38
6.8	Robustez	38
6.8.1	Definición.....	38
6.8.2	Ensayo de robustez.....	38
7	<i>Uso de métodos validados</i>	40
8	<i>Empleo de los datos de validación para el diseño del programa de control de calidad</i>	42
8.1	Introducción.....	42
8.2	Control de calidad interno.....	42
8.3	Control de calidad externo	43
9	<i>Documentación de los métodos validados.....</i>	44
9.1	Desde el borrador a la versión final.....	44
9.2	Recomendaciones.....	44
9.2.1	Comprobación de las indicaciones	44
9.2.2	Recomendaciones en normas	44
9.2.3	Control de los documentos	44
10	<i>Implicaciones de los datos de validación para el cálculo e informe de resultados....</i>	46
<i>Anexo A – Protocolo para la documentación del Método</i>		47
<i>Anexo B – Bases estadísticas del cálculo del límite de detección</i>		51
<i>Anexo C – Análisis de la varianza (ANOVA).....</i>		52
<i>Anexo D – Notas sobre los análisis cualitativos.....</i>		54
<i>Bibliografía.....</i>		57

Prólogo a la primera edición española

Con mi incorporación como representante nacional, a través de Eurolab España, al foro de EURACHEM pretendo extender las actuaciones del mismo a nuestro ámbito geográfico, así como participar de forma activa en los diferentes grupos de trabajo ya constituidos y activos.

En este sentido, en el año 2012 se propone la revisión de esta guía, constituyéndose un Grupo de Trabajo cuyo resultado se cierra en octubre de 2014 con la publicación de la segunda edición de la versión original en inglés.

Esta revisión era necesaria consecuencia de los avances producidos en el conocimiento técnico y en la entrada, inevitable por otro lado, de los conceptos metroológicos en el mundo de los ensayos químicos. La experiencia de los laboratorios ha permitido también mejorar la comprensión de conceptos casi exclusivos de la metrología física como veracidad, repetibilidad, reproducibilidad o incertidumbre, e incorporar las particularidades propias relacionadas con, por ejemplo, la selectividad o la robustez de los análisis químicos.

Durante este tiempo se han recibido gran número de consultas sobre la disponibilidad de una versión de la guía en español, que ahora se publica gracias al esfuerzo realizado por el Grupo de Trabajo creado al efecto.

He tenido el placer de colaborar en la traducción y coordinar a las personas que desinteresadamente han participado en este Grupo de Trabajo, constituido por:

Ana Inés Silva Terra	LATU Uruguay (www.latu.org.uy)
Christian Uribe / Steve Acco	INACAL Perú (www.inacal.gob.pe)
Gladys Mastromonaco	INTI Argentina (www.inti.gob.ar)
José Luis Prieto	LOMG España (www.lomg.net)
Mercedes Torres Roldán	SOCIEDAD ESPAÑOLA DE QUÍMICA ANALÍTICA (http://seqa.es)
Pedro Pablo Morillas	CANAL DE ISABEL II GESTIÓN (www.canalgestion.es) Eurolab España (www.eurolab.org.es)

En la revisión completa del documento he recibido la inestimable ayuda de Mercedes Torres (Sociedad Española de Química Analítica - SEQA), y Christian Uribe y Steve Acco del Instituto Nacional de Calidad (INACAL) de Perú. Espero que esta traducción permita facilitar la difusión y acceso a esta guía.

Pedro Pablo Morillas Bravo
Representante Nacional de EURACHEM para España

eurolab España

Prólogo a la segunda edición en inglés

Desde la publicación de la primera edición de esta Guía en 1998, han ocurrido acontecimientos importantes en el campo de la calidad analítica. En primer lugar, ha sido revisada la serie de la norma ISO 9000, utilizada muy frecuentemente como base de los sistemas de gestión de la calidad. Su filosofía es parte integrante de las normas y guías internacionales de evaluación de la conformidad, en las que se sustentan los requisitos de competencia de los laboratorios, de proveedores de Ensayos de Aptitud (PT, por sus siglas en inglés) y productores de Materiales de Referencia (RM, por sus siglas en inglés). En todos estos documentos se hace hincapié en la importancia de emplear métodos validados.

En segundo lugar, se han revisado o desarrollado guías de carácter general o más específico sobre validación de métodos. La legislación europea incluye requisitos obligatorios para las mediciones analíticas en muchos sectores.

En tercer lugar, la comunidad analítica ha invertido un gran esfuerzo en la aplicación del concepto de incertidumbre. Por ejemplo, la IUPAC en su Guía armonizada para la validación de métodos de análisis por un laboratorio (2002) predijo que, "...con una dependencia creciente sobre la incertidumbre de medida como indicador de la adecuación al uso y de la fiabilidad de los resultados, los químicos analíticos orientarán la validación de las medidas hacia una mejor evaluación de la incertidumbre...". Posteriormente, las entidades de acreditación difundieron políticas y guías reconociendo claramente el uso de los datos de validación de los métodos en el proceso de evaluación de la incertidumbre de las medidas.

Por otro lado, se ha revisado a fondo el Vocabulario Internacional de Metrología - conceptos básicos y generales y términos asociados (VIM), teniendo en cuenta las medidas químicas y biológicas. Aunque la terminología relacionada con la validación de métodos está lejos aún de ser armonizada, la situación ha mejorado. VIM es también un documento normativo para los laboratorios acreditados para, por ejemplo, ISO/IEC 17025 e ISO 15189.

La segunda edición de esta Guía tiene como objetivo reflejar los cambios ocurridos en las normas y guías internacionales, poniendo menos énfasis en los términos y definiciones. En su lugar, la Guía hace referencia al VIM y a otras fuentes de fácil acceso. Como consecuencia, se ha eliminado del Anexo la lista de términos y definiciones. Las referencias citadas en esta edición se incluyen en un apartado final de Bibliografía. Otras fuentes y referencias adicionales relacionadas con el desarrollo de métodos y su validación está disponible en el documento '*Reading list*' bajo la opción de menú '*Publications*' en la página web de Eurachem (www.eurachem.org). El anexo A se ha revisado para responder a los cambios en la norma ISO 78-2. Esta edición también se ha ampliado para incluir información sobre las bases estadísticas del cálculo del límite de detección (Anexo B), el análisis de varianza (Anexo C) y ensayos cualitativos (Anexo D).

Cada vez es más común entre los laboratorios de rutina, especialmente en el sector clínico, el uso de sistemas de medida disponibles en el mercado. Esto significa que la responsabilidad de la validación reside principalmente en el fabricante. El trabajo del laboratorio se orientará en la verificación de los datos de desempeño publicados del fabricante y en demostrar que el método funciona en las instalaciones del usuario final.

Sin embargo, considerando el prólogo de la primera edición, aún podemos decir que los seis principios en él recogidos siguen siendo relevantes, y consistentes con los requisitos de normas internacionales como la ISO/IEC 17025.

Prólogo a la primera edición en inglés*

Una iniciativa para promover buenas prácticas en la medición analítica en el Reino Unido ha identificado seis principios de la práctica analítica que, en conjunto, se considera que constituye la ‘mejor práctica’. Los seis principios que se describen en más detalle en esta guía[†] son:

1. “Las medidas analíticas deberían realizarse para satisfacer un requisito acordado” (ej.: con un objetivo definido).
2. “Las medidas analíticas deberían realizarse con métodos y equipos que previamente han sido probados para asegurar su adecuación al uso.”
3. “El personal que realiza medidas analíticas debería estar cualificado y ser competente para realizar sus tareas.” (y demostrar que pueden realizar correctamente los análisis).
4. “Debería existir una evaluación periódica e independiente del desempeño técnico de un laboratorio.”
5. “Las medidas analíticas realizadas en un lugar deberían ser consistentes con las realizadas en otros lugares.”
6. “Las organizaciones que realizan medidas analíticas deberían definir procedimientos adecuados de control y de aseguramiento de calidad.”

Estos principios son aplicables tanto a laboratorios que trabajan independientemente como a aquellos cuyos resultados deben ser comparados con los de otros laboratorios.

Este documento está destinado principalmente a ayudar a los laboratorios a aplicar el Principio 2, dando una orientación sobre la evaluación de los métodos de ensayo en su adecuación al uso.

* La primera edición (1998) de esta Guía ha sido elaborada por un Grupo de Trabajo de Eurachem a partir de un borrador preparado inicialmente por LGC. Las siguientes personas han sido miembros del grupo de Eurachem: D. Holcombe, P. De Bièvre, D. Böttger, C. Eastwood, J. Hlavay, M. Holmgren, W. Horwitz, M. Lauwaars, B. Lundgren, L. Massart, J. Miller, J. Morkowski, B. te Nijenhuis, B. Nyeland, R. Philipp, P. Radvila, J. Smeyers-Verbeke, R. Stephany, M. Suchanek, C. Vandervorst, H. Verplaetse, H. Wallien, M. Walsh, W. Wegscheider, D. Westwood, H. J. van de Wiel.

[†] The manager’s guide to VAM, UK Department of Trade and Industry, Valid Analytical Measurement Programme. Published as VAM Principles M. Sargent. Anal. Proc., 1995, 32, 201-202.

Abreviaturas y símbolos

En esta guía se utilizan las siguientes abreviaturas, acrónimos y símbolos.

AMC	Comité de Métodos Analíticos
ANOVA	Análisis de varianza
AOAC International	Organización reconocida globalmente para la elaboración de normas
ASTM International	Organización reconocida globalmente para la elaboración de normas
BIPM	Oficina Internacional de Pesos y Medidas
CCQM	Comité Consultivo de Cantidad de Sustancia – Metrología Química
CEN	Comité Europeo de Normalización
CITAC	Cooperación sobre Trazabilidad Internacional en Química Analítica
CLSI	Instituto de Normas Clínicas y Laboratorios
CRM	Material de referencia certificado
DER	Desviación estándar relativa
EA	Cooperación Europea para la Acreditación
EC	Comisión Europea
EPA	Agencia de Protección Medioambiental
EQA	Evaluación externa de la calidad
EU	Unión Europea
EPTIS	Sistema de Información Europeo de Ensayos de Aptitud
GUM	Evaluación de datos de medida – Guía para la expresión de la incertidumbre de medida
ICH	International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use
IEC	Comisión Internacional de Electrotecnia
ISO	Organización Internacional de Normalización
IUPAC	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada
JCGM	Comité Conjunto de Guías en Metrología
LOD	Límite de detección
LOQ	Límite de cuantificación
MR	Material de referencia
MRC	Material de referencia certificado
NATA	Asociación Nacional de Entidades para los Ensayos
NT	Nota del Traductor
QA	Aseguramiento de calidad
QC	Control de calidad
RSC	Real Sociedad de Química
SANCO	Comisión Europea de la Dirección General de Sanidad y Protección de los Consumidores
PNT	Procedimiento normalizado de trabajo
PT	Ensayo de aptitud

UV/VIS	Ultravioleta/visible
VIM	Vocabulario Internacional de metrología – conceptos básicos y generales y términos relacionados
b	Sesgo absoluto
$b(\%)$	Sesgo relativo en porcentaje
k_Q	Factor utilizado en el cálculo del límite de cuantificación
m	Número de medidas
n	Número medio de observaciones repetidas al reportar los resultados
n_b	Número medio de observaciones del blanco al calcular la corrección por el blanco
r	Límite de repetibilidad
R	Límite de reproducibilidad
$R(\%)$	Recuperación relativa (recuperación aparente) en tanto por ciento
$R'(\%)$	Recuperación relativa por fortificación en tanto por ciento
s	Desviación estándar
s_0	Desviación estándar estimada de los resultados individuales en o cerca de una concentración de cero
s'_0	Desviación estándar utilizada en el cálculo de un LOD o LOQ
s_I	Desviación estándar por precisión intermedia
s_r	Desviación estándar por repetibilidad
s_R	Desviación estándar por reproducibilidad
u	Incertidumbre típica
\bar{x}	Valor medio (media aritmética)
x_{ref}	Valor de referencia
\bar{x}_{ref}	Valor medio de medidas obtenidas con un método alternativo, ej.: un método de referencia
\bar{x}'	Valor medio de una muestra enriquecida en un experimento de recuperación
$x_{\text{adición}}$	Concentración adicionada en un experimento de recuperación

1 Introducción

1.1 Justificación y alcance de esta Guía

La validación de métodos es un requisito importante en la práctica de los análisis químicos. Si bien la mayoría de los químicos analíticos son conscientes de ello, no siempre está claro por qué y cuándo debe realizarse y qué es necesario hacer. Algunos consideran que la validación de métodos debe realizarse en colaboración con otros laboratorios, por lo que no la llevan a cabo. Los requisitos de las normas ISO/IEC 17025 [1], ISO 15189 [2] e ISO 15195 [3] han ayudado a clarificar este tema. Por ejemplo, la necesidad de demostrar que los métodos deben adecuarse a su uso previsto se indica claramente en el apartado 5.4.2 de la ISO/IEC 17025:

“El laboratorio debe utilizar los métodos de ensayo o de calibración, incluidos los de muestreo, que satisfagan las necesidades del cliente y que sean apropiados para los ensayos o las calibraciones que realiza...” y además: *“Cuando el cliente no especifique el método a utilizar, el laboratorio debe seleccionar los métodos apropiados...”*.

La finalidad de esta guía es analizar las cuestiones relacionadas con la validación de métodos y aumentar la comprensión de los lectores de lo que implica, por qué es importante, y dar una idea de cómo puede llevar a cabo.

Se prevé que la Guía sea de mayor utilidad para: a) los jefes de laboratorio encargados de velar por que los métodos bajo su supervisión se validen adecuadamente y b) los analistas responsables de la planificación y la realización de estudios de validación de métodos. Otros miembros del personal pueden encontrar en la guía un recurso de información de referencia - el personal directivo verla desde el punto de vista de gestión y el personal subordinado desde un punto de vista técnico o educativo.

La Guía se centra en la validación interna de métodos, realizada por el propio laboratorio. Su objetivo es dirigir al lector hacia protocolos ya establecidos y, en caso de no existir, dar una introducción sencilla a los procesos involucrados en la validación, proporcionando algunas ideas básicas que permitan al lector diseñar sus propias estrategias de validación. Incluye además

referencias a material adicional sobre determinados aspectos técnicos de la validación.

Esta Guía se centra en la validación de métodos cuantitativos. Sin embargo, algunos de los principios descritos en ella son aplicables también para determinar la presencia de uno o más analitos en los métodos cualitativos, como por ejemplo, los conceptos de selectividad y de límite de detección (LOD).

La Guía evita hacer hincapié en el uso de la estadística, aunque es indudable que el conocimiento práctico de estadística elemental facilita la comprensión y aplicación del proceso de validación. Se incluyen varias referencias a publicaciones de estadística básica para químicos [4, 5, 6].

La comprensión de la validación de métodos por los analistas se ve frenada porque los términos metrológicos y técnicos utilizados para describir los procesos de evaluación de métodos varían en los diferentes sectores de las mediciones analíticas. Esta Guía no dice cuando un término se usa correcta o incorrectamente, pero sí proporciona alguna aclaración. El mejor consejo para el uso de un término que puede inducir a error es proporcionar la fuente y el convenio de aplicación.

En el proceso de validación de métodos está implícito que los estudios para determinar sus características de desempeño* se llevan a cabo empleando equipos que funcionan correctamente, debidamente calibrados y dentro de especificación. Por tanto, esta Guía no contempla específicamente conceptos como “cualificación del equipo” o “cualificación instrumental”. Asimismo, el analista que realice los estudios debe ser competente en el campo de trabajo concreto, y contar con los conocimientos suficientes para poder tomar las decisiones que puedan ser necesarias al avanzar el estudio.

1.2 Notas sobre el uso de esta Guía

1.2.1 Terminología

El foco de atención principal en la revisión de esta Guía ha sido la actualización de las referencias bibliográficas para incorporar los

* Sinónimos de uso común para las características de desempeño del método son “parámetros de desempeño del método”, “características metrológicas” y “propiedades de desempeño”.

cambios y avances ocurridos desde la publicación de la primera edición hace ya quince años. En cuanto a la terminología, hemos empleado, donde ha sido posible, la 3ª edición del VIM, primera publicación de 2007 [7, 8]. Cuando ha sido necesario, se ha completado con los términos usados en la ISO/IEC 17025:2005 [1], otros documentos ISO [9, 10, 11] y la Guía Armonizada de la IUPAC para la Validación Interna de 2002 [12] contemplando así los términos usados habitualmente en los laboratorios analíticos.

Cuando existen varios términos en uso, puede resultar complicado decidir cuál de ellos emplear. Para ayudar en estas situaciones, en la Guía se ha decidido usar siempre el mismo término. Un ejemplo es el término utilizado para describir el documento que describe con detalle el método a validar empleando equipos y personal de un laboratorio en particular. Para análisis cuantitativos VIM se refiere al *procedimiento de medida*, en ISO/IEC 17025 se menciona como el *método*, en ISO 15189 [2] es el *procedimiento de examen* y en muchos otros laboratorios se llama *procedimiento normalizado de trabajo (PNT)*. El grupo de trabajo decidió utilizar el término de la ISO/IEC 17025 y emplear el término genérico *método*. Por tanto, esta Guía utiliza la locución ‘validación del método’ reconocida habitualmente, aunque ‘validación del procedimiento’ sería más correcto.

Se ha empleado los términos ‘robustez’ y ‘selectividad’ en lugar de ‘resistencia’ y ‘especificidad’ [13] ya que los primeros son empleados por la IUPAC [12].

Otros términos se utilizan para describir el trabajo del laboratorio, como ‘calibración’, ‘medición’, ‘prueba’, ‘análisis’ y ‘examen’. Esta Guía utiliza ‘análisis’ en un sentido general especificando, donde sea necesario, las circunstancias. Del mismo modo, esta Guía utiliza el término ‘concentración medida’ aunque en los laboratorios químicos se evalúan también otras magnitudes [14].

En los procesos de muestreo, preparación de muestras y análisis pueden emplearse términos como ‘objetivo del muestreo’, ‘muestra elemental’, ‘incremento’, ‘muestra compuesta’, ‘submuestra’, ‘muestra de laboratorio’, ‘muestra a ensayo’, ‘porción de ensayo’ y ‘disolución a examen’ [15, 16]. En esta Guía se utiliza normalmente el término ‘muestra’ o ‘muestra a ensayo’ [17].*En el texto de la Guía se han incluido las definiciones de los términos más importantes empleados. Siempre que ha sido posible, se han facilitado las definiciones de VIM, ISO 9000 [9] y la IUPAC [17, 18]. Los términos de VIM relacionados con la química analítica tienen mayor desarrollo en la Guía Eurachem “Terminology in analytical measurement” [8]. Los lectores deben tener en cuenta que aún no hay un acuerdo universal sobre las definiciones de los términos usados en la validación de métodos.

1.2.2 Referencias rápidas

En la Sección 6, las casillas sombreadas proporcionan una ‘Referencia Rápida’ sobre las características de desempeño específicas del método. Sin embargo, se asume que en muchos casos, los laboratorios no disponen de tiempo ni recursos para realizar los experimentos con el detalle que aquí se describe. El empleo de un menor número de réplicas que las indicadas en las cajas siempre será mejor que no llevar a cabo ninguna de las operaciones indicadas. En este caso, no hay que olvidar que la información obtenida será menos fiable que al considerar todas las réplicas propuestas.

* Muestra a ensayo: Muestra, preparada a partir de la muestra del laboratorio, de la que se extraen porciones para ensayo o análisis [17].

2 ¿Qué es validar un método?

2.1 Definiciones

En la Tabla 1 se incluyen las definiciones de **validación** de tres documentos internacionales. **Validar un método** es básicamente el proceso para definir un requisito analítico, y la confirmación de que cuenta con capacidades consistentes con las aplicaciones requeridas. Inherente a esto está la necesidad de evaluar el desempeño del método. Es importante la valoración de la idoneidad del método; en el pasado la validación del método se centraba solo en la evaluación de las características de desempeño.

Las actividades de validación de métodos y el desarrollo de métodos están estrechamente ligadas. Muchas de las características de desempeño (Tabla 2) que se evalúan durante la validación, también lo son en mayor o menor medida, durante el desarrollo del método. Sin embargo, es importante recordar que debe realizarse la validación formal de la versión final del método (el procedimiento documentado).

Algunos sectores utilizan los conceptos de ‘validación primaria’ y ‘validación secundaria’, esta última con el sentido de verificación [19]. Los conceptos de ‘cualificación’ y ‘confirmación metrológica’ [20] también cubren el sentido de verificación (Tabla 1).

2.2 ¿Cuál es la diferencia entre validación y verificación?

La ISO 9000 [9] define verificación como “confirmación, a través de la aportación de evidencias objetivas, de que se cumplen los requisitos especificados”. Esta es muy similar a la definición de validación dada en la Tabla 1. El VIM [7] establece que la verificación es “la aportación de evidencia objetiva de que un elemento dado satisface los requisitos especificados” y que validación es una “verificación, donde los requisitos especificados son adecuados para un uso previsto”.

Un laboratorio puede adoptar un procedimiento validado que, por ejemplo, ha sido publicado como una norma, o adquirir un sistema de medida completo y emplearlo para una aplicación específica a partir de un desarrollo comercial. En ambos casos el trabajo de validación básica se ha realizado, pero el laboratorio debe **confirmar** su capacidad para aplicar el método. Esta es la **verificación**. Esto implica que debe realizarse algún trabajo experimental para demostrar que el método funciona adecuadamente en el laboratorio. Sin embargo, la carga de trabajo es probable que sea considerablemente menor en comparación con la validación de un método que se ha desarrollado internamente. Los términos validación y verificación se discuten en detalle en la Guía Eurachem sobre terminología en las medidas analíticas [8].

Tabla 1 – Definiciones del concepto de ‘validación’ en ISO 9000, ISO/IEC 17025 y VIM

Definición	Referencia
confirmación, a través de la aportación de evidencia objetiva, de que se han cumplido los requisitos para un uso o aplicación específico previsto	ISO 9000 [9] ^a
confirmación, a través del examen y aportación de evidencias objetivas, de que se cumplen los requisitos particulares para un uso específico previsto	ISO/IEC 17025 [1]
verificación, donde los requisitos especificados son adecuados para un uso previsto	VIM [7] ^b
^a ISO 9000 define ‘proceso de calificación’, como “el proceso para demostrar la capacidad de cumplir los requisitos especificados” ^b VIM define ‘verificación’ como “aportación de evidencia objetiva de que un elemento dado satisface los requisitos especificados”	

Tabla 2 – Información general sobre las características de desempeño evaluadas habitualmente durante la validación del método

Características de desempeño
Selectividad
Límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ)
Intervalo de trabajo
Sensibilidad analítica
Veracidad <ul style="list-style-type: none">• Sesgo, recuperación
Precisión <ul style="list-style-type: none">• repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad
Incertidumbre de medida ^a
Robustez
^a En sentido estricto, la incertidumbre de medida no es una característica del desempeño de un procedimiento de medida particular pero sí de los resultados obtenidos al usar dicho procedimiento.

3 ¿Por qué es necesario validar un método?

3.1 Importancia de la medición analítica

Millones de pruebas, mediciones y exámenes se hacen cada día en miles de laboratorios de todo el mundo. Hay innumerables razones que las sustentan, por ejemplo para valorar bienes con fines comerciales; apoyar la asistencia sanitaria; controlar la calidad de agua potable, alimentos y piensos; analizar la composición elemental de una aleación para confirmar su idoneidad para su uso en la construcción de aviones; el análisis forense de los fluidos corporales en las investigaciones criminales. Prácticamente todos los aspectos de la sociedad se apoyan, de alguna manera, en el trabajo analítico.

El coste de llevar a cabo estas mediciones es alto y pueden surgir costes adicionales en base a las decisiones tomadas a partir de los resultados. Por ejemplo, los ensayos que demuestren que los alimentos son no aptos para el consumo pueden derivar en indemnizaciones por reclamación; los ensayos que confirman la presencia de sustancias prohibidas pueden generar sanciones económicas, encarcelamiento o incluso, en algunos países, la ejecución. Está claro que es importante hacer una correcta medición y ser capaz de demostrar que el resultado es correcto.

3.2 El deber profesional del químico analítico

Si el resultado de un análisis no genera confianza, entonces tiene poco valor y el análisis puede mejor no llevarse a cabo. Cuando los clientes solicitan trabajos analíticos a un laboratorio, se supone que el laboratorio tiene un grado de conocimiento técnico que los clientes no tienen. El cliente espera confiar en los resultados recibidos y, por lo general, sólo los cuestiona cuando surge una controversia. Así, el laboratorio y su personal tienen la responsabilidad de brindar confianza al cliente, proporcionando una respuesta correcta a la parte analítica del problema, en otras palabras, demostrar la 'adecuación al uso'. Implícitamente los ensayos llevados a cabo son apropiados para responder a la parte analítica del problema que el cliente desea resolver, y el informe final presenta los datos analíticos de tal manera que el cliente pueda comprender fácilmente y sacar las conclusiones pertinentes. La validación del método permite a los químicos demostrar que un método es 'adecuado para el uso previsto'.

Para un resultado analítico, ser apto para su uso implica que éste debe ser lo suficientemente fiable para que cualquier decisión basada en él, pueda ser tomada con confianza. Debe validarse el desempeño de un método y estimar la incertidumbre del resultado, para un determinado nivel de confianza. La incertidumbre se debe evaluar y citar de tal manera que sea ampliamente reconocida, internamente consistente y fácil de interpretar [21]. La mayor parte de la información requerida para evaluar la incertidumbre puede ser obtenida durante la validación del método. Este tema se aborda brevemente en la Sección 6.7 y en más detalle en la Eurachem / CITAC Guía de Cuantificación de la Incertidumbre en Mediciones Analíticas [22].

Independientemente de la bondad de un método y de uso rutinario, un problema analítico puede ser resuelto mediante el análisis de muestras sólo si éstas son adecuadas. Tomar las muestras apropiadas es un trabajo especializado, que requiere de una comprensión del problema y su relación química. Un laboratorio debe, siempre que sea posible, ofrecer asesoramiento al cliente sobre la toma de muestras como parte de su atención al cliente. Es evidente que habrá ocasiones en las que el laboratorio no pueda realizar o influir en la toma de las muestras. En estos casos, los resultados de los análisis tendrán que ser informados haciendo clara mención a esta situación.

Nos hemos centrado esencialmente (y con razón) en el objetivo general de realizar la validación de un método, es decir, demostrar que los métodos son 'adecuados al uso previsto'. Sin embargo, hay que reconocer que un estudio de validación del método proporciona beneficios adicionales al laboratorio que lo realiza. Proporciona un conocimiento sólido y experiencia en los detalles prácticos para llevar a cabo el método, incluyendo el conocimiento de las etapas críticas del proceso. La validación da al laboratorio y sus empleados una mayor confianza en sus propios resultados.

3.3 Desarrollo de métodos

El trabajo de validación está precedido de una fase de desarrollo que incluye a diferentes miembros del personal y que puede realizarse de varias formas.

Por un lado, puede implicar la adaptación de un método ya existente realizando cambios menores

para adecuarlo a una nueva aplicación. Por ejemplo, un método para determinar tolueno en agua puede ser adaptado a partir de un método establecido para el benceno en agua. La matriz es la misma, y los dos analitos tienen propiedades muy similares. Es probable que los mismos principios de separación, identificación, cuantificación que se aplican al benceno también puedan ser aplicables al tolueno. Si, por el contrario, se requiere un método para determinar el benceno en el suelo, la adaptación del método de benceno en agua puede no ser la mejor opción. La adaptación de algún otro método para la determinación de materia orgánica en el suelo puede ser un mejor punto de partida.

Por otro lado, el químico analítico puede comenzar a esbozar algunas ideas y aplicar su

conocimiento y experiencia para idear un método adecuado. Esto implica claramente mucho más trabajo y más dudas sobre la idoneidad del método final. No es inusual para el desarrollo del método trabajar con varias ideas simultáneamente antes de elegir finalmente la más adecuada.

A pesar del esfuerzo invertido en el desarrollo del método, no hay ninguna garantía de que el método vaya a funcionar adecuadamente durante la validación (o bajo condiciones de rutina en un laboratorio particular). Al implicar a diferente personal en la fase de desarrollo y de validación, se puede comprobar que las instrucciones (del procedimiento de medición) se entienden y se aplican.

4 ¿Cuándo debe validarse o verificarse un método?

4.1 Validación de un método

Un método debe ser validado cuando es necesario demostrar que sus características de desempeño son adecuadas para el uso previsto. Por ejemplo, se indica en el apartado 5.4.5.2 de la Norma ISO/IEC 17025 [1] que el laboratorio debe validar:

- métodos no normalizados;
- métodos diseñados/desarrollados por el laboratorio;
- métodos normalizados usados fuera de su ámbito de aplicación;
- ampliaciones o modificaciones de métodos normalizados.

La validación debe ser tan amplia como sea necesaria para cumplir con los requisitos en relación con el uso dado o la aplicación [23]. La extensión ('alcance') de la validación dependerá de la aplicación, la naturaleza de los cambios realizados y de las circunstancias en que el método se va a utilizar.

También debe validarse cuando es necesario demostrar la equivalencia de los resultados obtenidos por dos métodos, por ejemplo, un método recientemente desarrollado y un método normalizados existente.

4.2 Verificación de un método

Para los métodos normalizados, tales como los publicados por, ejemplo, ISO o ASTM, no es necesario validar el método utilizado por el laboratorio. Sin embargo, el laboratorio necesita verificar el desempeño del método como se detalla en la norma ISO/IEC 17025 apartado 5.4.2:

... El laboratorio debe confirmar que puede operar adecuadamente los métodos normalizados antes de introducir los ensayos o calibraciones.

También es necesaria la verificación cuando hay cambios importantes, como el uso de un equipo nuevo (pero similar), traslado de equipos, etc.

En los laboratorios clínicos la mayor parte de los ensayos se realizan con procedimientos comerciales previamente validados por los fabricantes y que deben ser verificados por el usuario final [24]. La ISO 15189 [2] hace hincapié en que *los procedimientos de examen usados sin modificaciones deben estar sujetos a una verificación independiente antes de ser usados como métodos de rutina*. También puede tenerse en cuenta la actualización del software de un equipo, o cuando los resultados de control de calidad indica que el desempeño del método cambia con el tiempo.

5 ¿Cómo debe validarse un método?

5.1 ¿Quién debe validar un método?

5.1.1 Estrategias para validar un método

Una vez finalizado el desarrollo inicial del método, el laboratorio debe documentar en detalle el procedimiento de medición (ver Anexo A). Este procedimiento documentado es el que se toma para la validación formal del método.

Existen dos estrategias fundamentales; el uso de resultados interlaboratorios y la validación del laboratorio individual. En cualquier caso, es responsabilidad del laboratorio que utiliza el método el asegurar la adecuación al uso del mismo, considerando entonces la necesidad de ampliar los trabajos de validación.

5.1.2 Resultados interlaboratorios

Hay un gran número de publicaciones sobre el uso de las comparaciones entre laboratorios, referidos como ‘estudios colaborativos’ o ‘estudios cooperativos’, como herramienta para validar métodos. Existen numerosos protocolos relacionados con este tipo de validación [25, 26, 27, 28], así como la familia de normas ISO 5725 [29] reconocida como aplicable de forma general. Si se está desarrollando un método con un alcance amplio, a partir de un método normalizado disponible, puede preferirse el uso de un estudio colaborativo entre varios laboratorios como forma de validación. Un método publicado validado por esta vía proporciona gran robustez. La información publicada contiene normalmente información sobre la precisión (repetibilidad, reproducibilidad o los correspondientes límites de precisión) y, a veces, una estimación del sesgo. Cuando un método ha sido validado por una organización internacional, como ISO, CEN o AOAC, el usuario solo necesita verificar los datos de desempeño publicados o establecer y confirmar sus propios valores de desempeño del método. Esta aproximación reduce, además, la carga de trabajo del laboratorio para el uso del método.

5.1.3 A partir de datos individuales del laboratorio

No siempre los métodos que pueda necesitar un laboratorio se encuentran publicados como normas. Si el método ha sido desarrollado para usarlo por un solo laboratorio, por ejemplo, porque no es de interés general o por que otros laboratorios son competidores, el enfoque de

validación a partir de datos individuales del laboratorio es el apropiado [12].

Los métodos validados por un solo laboratorio serán aceptables con fines regulatorios dependiendo de las directrices que cubre el área de medición afectada. Normalmente debería ser posible obtener una declaración política clara del organismo regulador correspondiente.

5.2 Extensión de los estudios de validación

El laboratorio tiene que decidir cuáles son las características de desempeño (ver Tabla 2 y Sección 6) que deben ser investigadas para validar el método y, en algunos casos, el grado de detalle para una característica particular. El protocolo de la IUPAC [12] enumera una serie de situaciones, que tienen en cuenta, entre otras cosas, el estado del método y la competencia técnica del laboratorio.

Cuando el alcance del trabajo de análisis está bien definido y sus aplicaciones son similares en el tiempo, puede ser posible que una organización o un sector puedan emitir guías generales para la extensión de las validaciones. En la Tabla 3 se muestra un ejemplo para el sector farmacéutico.

Se puede empezar con una cuidadosa descripción analítica en el alcance del procedimiento documentado (ver A.5 en el Anexo A) lo que proporcionaría una buena base para planificar el proceso de validación; sin embargo en la práctica, esto no siempre es posible. La evaluación del desempeño del método puede verse limitada. Así se reconoce en la ISO/IEC 17025, apartado 5.4.5.3 como *La validación es siempre un equilibrio entre costos, riesgos y posibilidades técnicas*. El laboratorio debe hacerlo lo mejor posible, teniendo en cuenta las limitaciones impuestas, los requisitos legales y de clientes, las experiencias y herramientas disponibles, (Sección 5.4), y la necesidad de compatibilidad metrológica [7] con otros métodos similares en uso dentro o fuera del laboratorio. Durante fase de desarrollo e implementación del método pueden determinarse algunas características de desempeño. Una planificación cuidadosa puede minimizar el esfuerzo a realizar, ya que un conjunto de experimentos puede proporcionar información sobre diferentes características del método.

Tabla 3 – Extensión de la validación para cuatro tipos de aplicaciones analíticas. Ejemplo para el sector farmacéutico [13]. ‘x’ significa una característica de desempeño que normalmente se valida

Característica de desempeño	Tipo de aplicación analítica			
	Ensayo de identificación	Ensayo de cuantificación de impurezas	Ensayo para límite de impurezas	Cuantificación del component principal
Selectividad	x	x	x	x
Límite de detección			x	
Límite de cuantificación		x		
Intervalo de trabajo incluyendo linealidad		x		x
Veracidad (sesgo)		x		x
Precisión (repetibilidad y precisión intermedia)		x		x
NOTA La tabla se ha simplificado y adaptado a la estructura y terminología de esta Guía.				

Las implicaciones de las limitaciones discutidas anteriormente son particularmente críticas, cuando el método no va a ser utilizado de forma rutinaria. El proceso de validación de métodos que van a ser utilizado de forma rutinaria está relativamente bien definido. Los mismos principios aplican claramente tanto para un análisis ‘ad hoc’ como para ensayos de rutina. Es necesario contar con un adecuado nivel de confianza en los resultados obtenidos. Establecer el equilibrio entre las limitaciones de tiempo y costes y la necesidad de validar el método es difícil. En algunas circunstancias, puede ser más apropiado subcontratar los análisis a otro laboratorio en el que se realicen de manera rutinaria.

5.3 Plan e informe de validación

Tanto los trabajos de validación como la información de sus resultados se realizarán atendiendo a un procedimiento documentado.

El esquema del plan de validación (‘protocolo de validación’) y el informe de la validación puede establecerse en guías sectoriales (ver Sección 5.5). Las Entidades Nacionales de Acreditación pueden establecer requisitos mínimos para esta documentación [23]. No obstante, un modelo sencillo combinando el plan y el informe de validación puede incluir, por ejemplo, las siguientes secciones.

- **Título:** En esta sección debe identificarse el método, el momento y quién realizó la validación. Se debe dar una breve información sobre el alcance y una sencilla

descripción del método, así como la información sobre el estado del método (por ejemplo, una norma internacional, un método desarrollado internamente, etc.), el analito, el mensurando, unidad de medida, el tipo de muestra y el uso previsto. Si el muestreo y el submuestreo son parte del procedimiento de medida deben ser validados. Incluso si estos pasos se llevan a cabo en otros lugares, es útil incluir información sobre ellos en el plan de validación/informe.

- **Planificación:** Esta sección debe describir el propósito, por ejemplo, validación completa de un nuevo método, verificación del desempeño de un método normalizado, extensión del alcance del método, etc. Debe indicarse la extensión de la validación, por ejemplo, indicando las características de desempeño que van a evaluarse y los requisitos asociados.
- **Características de desempeño:** Esta sección incluirá una breve explicación de las características de desempeño del método, requerimientos específicos, descripción de los experimentos a realizar y la evaluación de los resultados obtenidos. Deben declararse los resultados y conclusiones derivados de los experimentos. Cada característica de desempeño se recoge en secciones separadas del informe.
- **Resumen:** La última sección debe recapitular el trabajo de validación y sus resultados. Pueden contemplarse además actuaciones relacionadas con el uso rutinario del método y con requisitos de control de calidad interno y

externo. Y lo más importante, debe realizarse una declaración sobre la adecuación al uso del

5.4 Herramientas de validación

5.4.1 Blancos

El uso de diversos tipos de blancos permite evaluar cuánta señal de medida es atribuible al analito y cuánta a otras causas. Varios tipos de blanco están disponibles para el analista:

- **Blancos de reactivos***: Los reactivos utilizados durante el proceso analítico (incluyendo disolventes utilizados para extracción o disolución) se analizan para determinar si contribuyen a la señal de la medida.
- **Blancos de muestra**. Se trata de Muestras matriz sin presencia de analito, por ejemplo, muestra de orina humana sin fármaco específico, o una muestra de carne sin residuo de hormonas. Los blancos de muestra pueden ser difíciles de obtener, pero son necesarios para tener una estimación más real de las interferencias que pueden aparecer en un análisis de muestras de rutina.

5.4.2 Muestras de rutina

Las muestras de rutina son útiles ya que proporcionan información sobre precisión, interferencias, etc., que pueden aparecer durante el trabajo diario. Si se conoce adecuadamente el analito contenido en el material a ensayo, se puede realizar una evaluación del sesgo de medida. El uso de un método de referencia puede proporcionar una estimación precisa sobre el contenido del analito, aunque estos métodos no siempre están disponibles.

5.4.3 Soluciones/material fortificado

Son materiales o soluciones en los que el analito(s) ha sido adicionado a valores conocidos. Debe ponerse atención en los valores de concentración de modo que la adición no supere el intervalo de trabajo del método. La fortificación con una cantidad conocida de analito permite incrementar la respuesta del analito medido, calculando los valores en términos de cantidad añadida, aún cuando el valor absoluto del analito presente no se conozca ni antes ni después de la adición. Hay que tener en cuenta que la adición de analito puede no

método. Tener en cuenta que esto es un requisito en la ISO/IEC 17025 [1].

tener el mismo comportamiento sobre la matriz en comparación con el analito presente naturalmente. Por tanto, la estimación del sesgo por esta vía puede resultar demasiado optimista.

La adición no tiene que limitarse al analito de interés. Se pueden adicionar otros componentes para medir el efecto de la adición. Así, se puede fortificar la muestra con cantidades de variables de un interferente particular para evaluar la concentración del interferente a la cual la determinación del analito se ve afectada negativamente. Obviamente, es necesario identificar la naturaleza de la adición.

5.4.4 Materiales pre-adicionados

Son materiales en los que el analito de interés puede ser básicamente extraño, pero ha sido incorporado en algún momento anterior al muestreo. El analito está así más estrechamente ligado en la matriz que en el caso de la adición. El valor del analito dependerá de la cantidad de analito en contacto con el material, la tasa de absorción y pérdida por efecto de la matriz y cualesquiera otras pérdidas a través del metabolismo, desintegración espontánea u otros procesos químicos o físicos. La utilidad en la validación de las muestras pre-adicionadas depende de en qué medida el analito puede ser caracterizado. Son ejemplos de materiales pre-adicionados:

1. Herbicidas en harina a partir de cereales pulverizados con herbicidas durante su crecimiento;
2. Componentes activos en formulaciones farmacéuticas añadidos durante la fase de formulación.
3. Polvo de clara de huevo (de contenido proteico conocido) añadido a una masa de galleta antes de hornear para la investigación de alérgenos.

5.4.5 Patrones de medida

En inglés, el término *standard* también hace referencia a las 'normas' o documentos escritos, como por ejemplo las normas ISO. Al referirse a sustancias empleadas con fines de identificación o calibración es preferible hablar de patrones de medida o calibrantes [7]. Tradicionalmente se identifican con soluciones de sustancias individuales, pero en la práctica puede ser todo aquello en lo cual ha sido caracterizado un parámetro o propiedad particular y que puede emplearse como referencia metrológica.

*Un blanco de reactivo aplicado a todo el procedimiento analítico se llama a veces 'blanco de ensayo'.

Hay que distinguir entre material de referencia (MR) y material de referencia certificado (MRC) [7, 30] ya que su uso en el proceso de validación es diferente (6.5.2). Los MR pueden ser cualquier material empleado como valor de referencia, ya sean reactivos de laboratorio de pureza conocida, productos químicos industriales u otros dispositivos. La propiedad o analito debe ser estable y homogénea pero no necesita contar con el alto grado de caracterización, trazabilidad metrológica, incertidumbre y documentación exigida a los MRC.

La caracterización del parámetro de interés en un MRC se controla de manera más rigurosa que un MR, y el valor caracterizado se certifica con un documento que demuestra su trazabilidad metrológica y en el que se declara su incertidumbre. La caracterización se realiza empleando varios métodos o con un procedimiento de medida primario, de modo que se elimine o minimice cualquier sesgo.

La evaluación del sesgo requiere de un valor de referencia fiable, preferiblemente un MRC con la misma matriz y en concentraciones del analito similares a las muestras reales.

5.4.6 Estadística

Las técnicas estadísticas son esenciales para agrupar los datos obtenidos y realizar un análisis objetivo de las diferencias entre conjuntos de datos (pruebas de significación). Los analistas deben familiarizarse con los elementos básicos de la teoría estadística como ayuda para la evaluación de la precisión, sesgo, rango lineal, LOD, LOQ e incertidumbre de medida. En la guía se incluyen varias referencias a libros de introducción a la estadística en química analítica [5, 6, 31, 32, 33, 34].

5.5 Requisitos de validación

Los requisitos de cómo realizar la validación de un método pueden estar recogidos en guías sectoriales [13, 25, 35 por ejemplo]. Se recomienda seguirlos, cuando estos requisitos existen. Esto permite asegurar que tanto la terminología como la estadística empleada se interpretan y aplican de manera consistente para el sector en particular. El reconocimiento de un método como oficial puede requerir una caracterización mediante un estudio colaborativo.

5.6 Proceso de validación de métodos

Ante una necesidad particular de un cliente, el laboratorio debe establecer en primer lugar el requisito analítico que define las características de desempeño que el método debe cumplir para resolver la necesidad (Figura 1). Como respuesta a esos requisitos, el laboratorio necesita identificar un método existente adecuado, o si es necesario desarrollar o modificar un método. Hay que tener en cuenta que algunas normas legales obligan a seguir determinados métodos. La Tabla 4 muestra preguntas tipo a la hora de formalizar un requisito analítico (columna 1) y la característica correspondiente de desempeño del método que necesita ser evaluada (columna 2), para a partir de aquí, identificar y evaluar las que correspondan frente al requisito analítico. El proceso de validación finaliza con una conclusión y declaración del cumplimiento o no del requisito establecido. Si el requisito no se cumple, el método requiere un mayor desarrollo. Este proceso de desarrollo y evaluación se mantiene hasta que el método demuestra su capacidad de cumplir el requisito.

En realidad, no es habitual acordar de antemano con los clientes los requisitos analíticos. Normalmente, los clientes definen sus requisitos en términos de tiempo y/o costes y desconocen los requisitos técnicos reales, aunque estos deben estar bien establecidos cuando se trata de métodos que dan apoyo a un requisito reglamentario o al cumplimiento de una especificación. Por ejemplo, La Unión Europea (EU) ha publicado requisitos para los análisis de agua de consumo humano [36], para los análisis relacionados con la directiva marco del agua [37], para la determinación de los niveles de residuos de fármacos de uso veterinario en alimentos de origen animal [38] y de residuos de pesticidas en alimentos y piensos [39]. Sin embargo, es usual dejar a la discreción del analista la decisión del requisito de desempeño. Esto supone, muy a menudo, establecer el requisito en base a la capacidad conocida del Método (por ejemplo, tal y como se publica en métodos normalizados, lo observado en ensayos de aptitud (PT) o las estimaciones de modelos matemáticos como la función de Horwitz [40]). Limitaciones financieras pueden condicionar que el desarrollo de un método que satisfaga unos requisitos analíticos particulares sea económicamente viable, en cuyo caso debe plantearse modificar los requerimientos o repensar la justificación de su puesta en rutina.

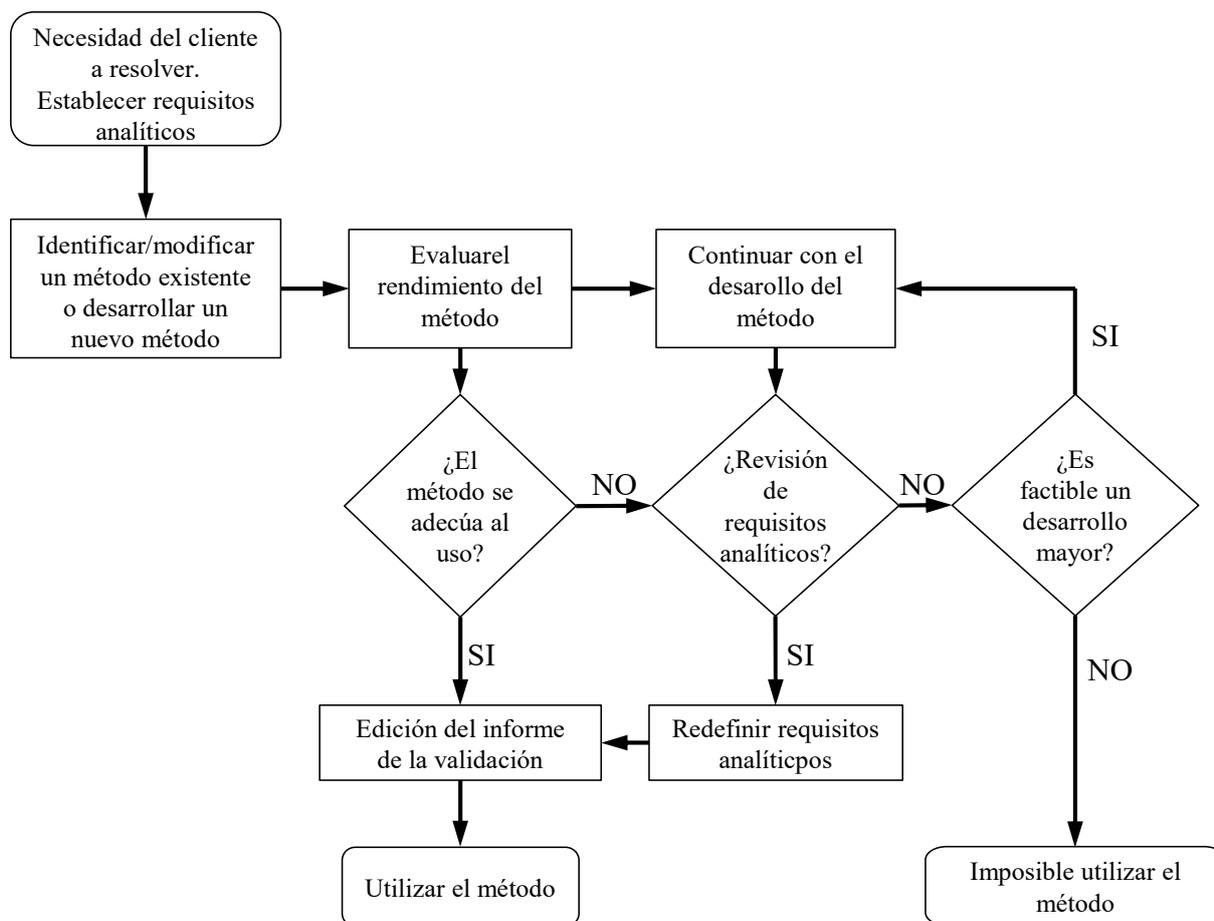


Figura 1 – El proceso de validación de un método: desde la necesidad del cliente hasta la decisión del laboratorio sobre la idoneidad del método. Nota: la validación del método comporta una fase en la que se evalúa el desempeño del método y se compara con los requisitos analíticos. Independientemente de los datos de desempeño existentes, la adecuación al uso se determina por el comportamiento del método al ser utilizado por un analista autorizado con los medios y equipos disponibles.

Tabla 4 – Preguntas que pueden plantearse para formalizar un requisito analítico, y que relacionan las características de desempeño con la sección correspondiente en esta Guía

Pregunta	Característica de desempeño	Sección	Nota
¿Hay restricciones en los recursos y cómo se aplican – el personal, el tiempo, el dinero, los equipos y los reactivos, las instalaciones de laboratorio?	-	-	a)
¿Se requiere muestreo y submuestreo (y se realiza por el laboratorio)?			
¿Hay limitaciones en el tamaño o disponibilidad de la muestra?			
¿Cuál es la naturaleza química, biológica y física de la matriz?			
¿El analito está disperso o localizado?			
¿Se requiere una respuesta cualitativa o cuantitativa?	Selectividad LOD y LOQ	6.1 6.2	
¿Cuáles son los analitos de interés presentes y los niveles probables (% $\mu\text{g g}^{-1}$, ng g^{-1} , etc)? ¿Están presentes en más de una forma química (i.e. estados de oxidación, estereoisómeros), y es necesario distinguir entre las diferentes formas?	Selectividad LOD y LOQ Intervalo de trabajo y linealidad	6.1 6.2 6.3	
¿Qué magnitud requiere ser medida ('el mesurando')? ¿Interesa medir la concentración 'total' del analito presente o la 'cantidad extraída' bajo condiciones concretas?	Recuperación	6.5	
¿Qué veracidad y precisión se requieren? ¿Cuál es la incertidumbre objetivo y como debe expresarse?	Veracidad y recuperación Repetibilidad, precisión intermedia, reproducibilidad Incertidumbre	6.5 6.6 6.7	b)
¿Cuáles son las interferencias más probables del analito(s)?	Selectividad	6.1	
¿Se han establecido tolerancias para los parámetros críticos de desempeño del análisis (i.e. tiempo de extracción, temperatura de incubación)?	Robustez	6.8	c)
¿Los resultados necesitan ser comparados con los de otros laboratorios?	Incertidumbre	6.7	b)
¿Los resultados necesitan ser comparados con especificaciones externas?	Incertidumbre	6.7	b)
<p>a) No todos los elementos de requerimiento analítico enlazan directamente con los requisitos de validación pero determinan de forma más general en qué medida son aplicables técnicas particulares. Por ejemplo, pueden emplearse diferentes técnicas si el analito está disperso en la muestra o aislado en su superficie.</p> <p>b) Un elemento esencial del requisito analítico es si es posible evaluar cuándo un método es adecuado al uso previsto, por lo que debe incluir la incertidumbre estimada expresada como incertidumbre estándar o incertidumbre expandida.</p> <p>c) Los procedimientos normalizados publicados generalmente han demostrado ser rigurosos en el alcance del procedimiento, es decir, tipos de matriz e intervalo de trabajo. Por lo tanto, la verificación del laboratorio para la aplicación de estos procedimientos normalmente no necesita incluir robustez.</p>			

6 Características de desempeño de los métodos

6.1 Selectividad

6.1.1 Términos y definiciones

La selectividad analítica se relaciona con “*el grado en el que un método puede ser utilizado para determinar analitos particulares en mezclas o matrices sin interferencias de otros componentes de comportamiento similar*” [41].

Las definiciones encontradas en diversos documentos [7, 18, 42] concuerdan relativamente con esta interpretación. Si bien IUPAC recomienda el término “selectividad”, algunas áreas, p. ej. el sector farmacéutico [13], utiliza “especificidad” o “especificidad analítica”. Este último término es recomendado para evitar confusión con “especificidad diagnóstica”, tal cual se utiliza en medicina de laboratorio [43].

6.1.2 Efectos de las interferencias

En general, se puede decir que los métodos analíticos consisten de una etapa de medición, la cual puede o no ser precedida por una etapa de aislamiento. En la etapa de medición, normalmente no se mide la concentración de un analito directamente. En su lugar, se cuantifica una propiedad específica (p. ej. la intensidad de la luz). Por lo tanto, es crucial establecer que la propiedad medida sólo se debe al analito y no a algo química o físicamente similar, o que surja como una coincidencia, causando así un sesgo en el resultado de medición. Puede ser necesario que la etapa de medición sea precedida por una etapa de aislamiento para mejorar la selectividad de un sistema de medición.

Las interferencias pueden causar un sesgo al exacerbar o disminuir la señal atribuida al mensurando. Usualmente, el grado en el que ocurre este efecto para una matriz particular es proporcional a la señal y por lo tanto, en ocasiones es denominado efecto “proporcional”. Esto cambia la pendiente de la función de calibración pero no la ordenada en el origen. Este efecto es también denominado “rotacional” [44].

Un efecto “traslacional” o “fijo” surge a partir de una señal producida por interferencias presentes en la solución de estudio. Por lo tanto, es independiente de la concentración del analito. Usualmente, se le refiere como interferencia de “fondo” o “línea de base”. Afecta a la ordenada en el origen en una función de calibración, pero no su pendiente.

No es inusual que ambos efectos proporcionales y traslacionales se encuentren presentes simultáneamente. El método de adiciones estándar solo permite corregir los efectos proporcionales.

6.1.3 Evaluación de la selectividad

La selectividad de un procedimiento debe ser establecida para métodos desarrollados internamente en el laboratorio, métodos adaptados de la literatura científica y métodos publicados por organismos de estandarización utilizados fuera del alcance especificado en el método estándar. Cuando los métodos publicados por organismos de normalización son aplicados dentro de su alcance, la selectividad usualmente habrá sido estudiada como parte del proceso de normalización.

Generalmente, la selectividad de un método se investiga estudiando su habilidad de medir el analito de interés en muestras a las cuales se le agregaron intencionalmente interferencias específicas (aquellas que se considere probable de encontrar en las muestras). En aquellos casos donde no esté claro si las interferencias ya están presentes o no, la selectividad del método puede ser investigada estudiando su habilidad de medir el analito comparado con otros métodos independientes. El Ejemplo 1 y el Ejemplo 2 junto con la Referencia Rápida 1 ilustra consideraciones prácticas sobre la selectividad.

Las técnicas de confirmación pueden ser útiles como medio para verificar identidades. Cuanta mayor cantidad de evidencia pueda recaudarse, mejor. Inevitablemente, es necesario alcanzar un equilibrio entre el costo y tiempo invertido en la identificación del analito y la confianza con la que uno decide si la identificación se efectuó correctamente.

Mientras que la evaluación de repetibilidad requiere que la medición se repita varias veces por una misma técnica, la confirmación de la identidad de un analito requiere que la medición se realice por varios métodos, preferentemente independientes. La confirmación incrementa la confianza de la técnica en examen y es especialmente útil cuando la técnica confirmatoria opera bajo principios significativamente diferentes. En algunas aplicaciones, por ejemplo, el análisis de compuestos orgánicos desconocidos por cromatografía gaseosa, el uso de técnicas

confirmatorias es esencial. Cuando el método de medición en evaluación es altamente selectivo, el uso de otras técnicas confirmatorias puede no ser necesario.

Un aspecto importante de la selectividad que debe ser considerado es el caso en el que un

analito pueda existir en la muestra en más de una forma, como ser: ligada o no, inorgánica u organometálica, o en diferentes estados de oxidación. En ese caso, la definición del mensurando es crítica para evitar confusión.

Ejemplo 1 – Cromatografía. Un pico en un cromatograma puede ser identificado como correspondiente al analito de interés basándose en que un MR conteniendo este analito genera una señal en el mismo punto en el cromatograma. Pero, ¿la señal se debe al analito o a algo más que incidentalmente co-eluye, es decir un efecto fijo? Es posible que cualquiera de estas opciones sea cierta o incluso ambas. La identificación del analito únicamente por este medio es poco confiable y por lo tanto se necesita evidencia complementaria. Por ejemplo, la separación cromatográfica podría repetirse usando una columna de polaridad distinta, empleando un principio de separación diferente para establecer si la señal y la señal generada por el MR continúan apareciendo al mismo tiempo. Cuando un pico se debe a más de un compuesto, una columna de polaridad diferente puede ser una buena forma de separar estos compuestos. En muchos casos, los instrumentos de espectrometría de masas modernos pueden ofrecer una gran selectividad, p. ej. cromatografía gaseosa o líquida con detección por espectrometría de masas.

Ejemplo 2 – Espectroscopia. En espectroscopia infrarroja, la identificación de compuestos desconocidos puede realizarse comparando señal de absorbancia (es decir “picos”) en el espectro del analito con espectros de referencia almacenados en una biblioteca espectral. Una vez que se considere que la identificación se realizó correctamente, se debería grabar el espectro de un MR del analito con exactamente las mismas condiciones que la muestra de estudio. Cuanta mayor cantidad de picos coincidan entre el analito y el MR, mayor confianza se puede tener en que la identificación se realizó correctamente. Adicionalmente sería beneficioso examinar como varía la forma del espectro en función de cómo se aisló y preparó el analito para el análisis por infrarrojo. Por ejemplo, si el espectro se grabó en un disco de sal, la distribución de tamaño de partícula de la muestra en el disco puede influenciar la forma del espectro.

Referencia Rápida 1 – Selectividad

Qué hacer	Cuántas veces	Qué calcular/determinar a partir de la información	Comentarios
Analice muestras de ensayo y MR por el método candidato y otros métodos independientes.	1	Use los resultados de las técnicas confirmatorias para evaluar la capacidad del método para confirmar la identidad del analito y su capacidad para medir el analito aislado de otras interferencias.	Decida qué cantidad razonable de información adicional es necesaria para conferir suficiente confiabilidad.
Analice muestras de ensayo conteniendo varias interferencias sospechadas en la presencia de los analitos de interés.	1	Examine el efecto de las interferencias. ¿La presencia de la interferencia inhibe la detección y cuantificación de los analitos?	Si la detección o cuantificación es inhibida por las interferencias, será necesario continuar con el desarrollo del método.

6.2 Límite de detección y límite de cuantificación

6.2.1 Términos y definiciones

Cuando las mediciones se realizan a concentraciones bajas, existen tres conceptos generales a considerar. En primer lugar, puede

ser necesario establecer un valor de resultado que es considerado un nivel de analito significativamente diferente de cero. Regularmente, alguna acción es requerida a este nivel, tal como declarar un material contaminado. Este nivel es conocido como

“valor crítico”, “límite de decisión”, o según directivas de la UE, CC α [38].

En segundo lugar, es importante conocer la concentración más baja del analito que puede ser detectada por el método a un nivel de confianza especificado. Es decir, ¿a qué concentración real se excederá con seguridad el valor crítico descrito anteriormente? Los términos como “límite de detección” (LOD), “valor mínimo detectable”, o, en las directivas de la UE, CC β [38], son utilizados para este concepto.

En tercer lugar, es adicionalmente importante establecer el nivel más bajo en el cual el desempeño es aceptable para una aplicación típica. Este tercer concepto usualmente es referido como el límite de cuantificación (LOQ)^{*}.

La terminología relacionada con estos conceptos es muy diversa y varía entre sectores. Por ejemplo, los términos “límite de detección” (LOD) o “límite detectable” (LD) previamente no eran generalmente aceptados, aunque se utilizaran en algunos documentos sectoriales [13, 38]. Sin embargo, ahora están incluidos en el VIM [7] y la IUPAC Gold Book [17]. ISO utiliza como término general “valor mínimo detectable de la variable en estado neto” lo cual se traduce para química como “la concentración neta mínima detectable” [45, 46, 47, 48]. En esta Guía los términos “valor crítico”, “límite de detección (LOD)” y “límite de cuantificación (LOQ)” son utilizados para los tres conceptos anteriores. En validación de métodos, comúnmente se determinan el LOD y el LOQ.

También es necesario distinguir entre el límite de detección del instrumento y el límite de detección del método. El límite de detección del instrumento puede basarse en el análisis de una muestra, usualmente un blanco de reactivo, sometido directamente al instrumento (es decir, omitiendo cualquier paso de preparación de muestra), o en la relación señal/ruido en p.ej. un cromatograma. Para obtener el límite de detección de un método, el LOD debe basarse en el análisis de muestras que hayan sido sometidas a todo el proceso de medición obteniendo resultados calculados con la misma ecuación que para las muestras de ensayo. El dato más útil para la validación del método es el límite de

detección del método, por lo que será el enfoque para esta Guía.

Los siguientes párrafos describen la estimación experimental de LOD y LOQ. La base estadística para el cálculo del LOD es suministrada en el Anexo B. Dado que ambos el LOD y LOQ dependen de la precisión en, o cerca de, cero, la Sección 6.2.2 primero describe la estimación experimental de la desviación estándar de resultados cercanos a cero.

6.2.2 Determinación de la desviación estándar a niveles bajos

Ambos LOD y LOC normalmente se calculan multiplicando una desviación estándar (s'_0) por un factor adecuado. Es importante que esta desviación estándar sea representativa de la precisión obtenida para muestras de ensayo típicas, y que se realicen suficientes réplicas de medición para brindar una estimación confiable. En esta sección, la desviación estándar s'_0 se basa en la desviación estándar s_0 para un único resultado cerca de cero, ajustado por cualquier promedio o corrección por blanco utilizado en la práctica (véase abajo). Se discuten planteos alternativos en la Sección 6.2.5.

Los siguientes puntos deberían ser considerados en el momento de determinar LOD y LOQ en un experimento que consiste en una única réplica.

Muestras adecuadas para estimar LOD y LOQ: Las muestras usadas deberían ser preferentemente o bien a) muestras blanco, es decir, muestras que no tengan cantidades detectables de analito, o b) muestras de ensayo con concentraciones de analito cercanas o por debajo del LOQ esperable. Las muestras blanco funcionan bien en métodos en los cuales se obtiene una señal medible para un blanco, como son la espectrofotometría y la espectroscopia atómica. Sin embargo, para técnicas como la cromatografía que se basan en detectar un pico por encima del ruido, se requieren muestras con niveles de concentración cercanas o por encima del LOD. Por ejemplo, estas pueden ser preparadas mediante el fortificado de una muestra blanco (véase Sección 5.4). Cuando no se encuentran disponibles muestras blanco o muestras de ensayo con bajas concentraciones, usualmente se pueden utilizar blancos de reactivo[†]. Cuando estos blancos de reactivo no

^{*} Algunos sinónimos utilizados incluyen “límite de determinación”, “límite de reporte” y “límite de aplicación”.

[†] Existe confusión sobre la terminología relacionada a los blancos – para información adicional véase la Sección 5.4.1.

son sometidos a todo el proceso de medición, y se presentan directamente frente al instrumento, los cálculos basados en estas mediciones darán como resultado el LOD/LOQ del instrumento.

Cubrir el alcance del método: Para aquellos métodos que cubren dentro de su alcance matrices muy diversas, puede ser necesario determinar la desviación estándar para cada matriz por separado.

Asegurar un replicado representativo: La desviación estándar debería ser representativa del desempeño del método tal como se aplica en el laboratorio, es decir, la desviación estándar debe ser calculada basándose en resultados obtenidos cuando el análisis se efectúa exactamente de acuerdo a todo el procedimiento de medición documentado, incluyendo cualquier paso de preparación de muestra. Los valores usados para calcular la desviación estándar s_0 deberían informarse en las unidades de medición especificadas en el procedimiento.

Condiciones de medición: La desviación estándar se obtiene normalmente bajo condiciones de repetibilidad y este es el procedimiento descrito en esta sección. Sin embargo, se puede obtener una estimación más confiable a partir del uso de condiciones de precisión intermedia. Este enfoque se discute con mayor detalle en la Sección 6.2.5.

Número de observaciones: El número de réplicas (m) debería ser suficiente para obtener un estimado adecuado de la desviación estándar. Típicamente se consideran necesarias de 6 a 15 réplicas; usualmente se recomiendan 10 réplicas en procedimientos/protocolos de validación (véase Sección 6.2.5.1).

Considerar el promedio: En varios procedimientos de medición se reporta el promedio de las réplicas durante el uso de rutina del método, donde cada replicado se obtiene siguiendo el procedimiento de medición entero. En este caso, la desviación estándar de cada resultado único s_0 debería ser corregida dividiéndola por la raíz cuadrada de n , donde n es el número de réplicas promediadas en el uso de rutina.

Considerar el efecto de correcciones por el blanco: Si se especifican correcciones por blanco en el procedimiento de medición, se debe tener precaución cuando se determina la desviación estándar utilizada para calcular LOD o LOQ. Si todos los resultados obtenidos durante el estudio de validación fueron corregidos por el

mismo valor de blanco – lo cual se recomienda aquí por simplicidad – la desviación estándar de los resultados será menor que la que se verá en la práctica cuando los resultados se corrijan por diferentes valores de blanco obtenidos en diferentes series. En este caso s_0 debería ser corregido multiplicándolo por $\sqrt{\frac{1}{n} + \frac{1}{n_b}}$ donde n es el número de réplicas de observaciones promediadas cuando se dan resultados para los que cada réplica es obtenida siguiendo la totalidad del procedimiento de medición, y n_b es el número de observaciones blanco usadas para calcular la corrección del blanco. Hay que considerar que bajo condiciones de precisión intermedia, los resultados se corregirán por valores de blanco diferentes, por lo que no es necesario corregir la desviación estándar (véase Sección 6.2.5). El Ejemplo 3 ilustra estos cálculos y el diagrama de flujo en la Figura 2 resume las correcciones necesarias para el promedio y la corrección del blanco.

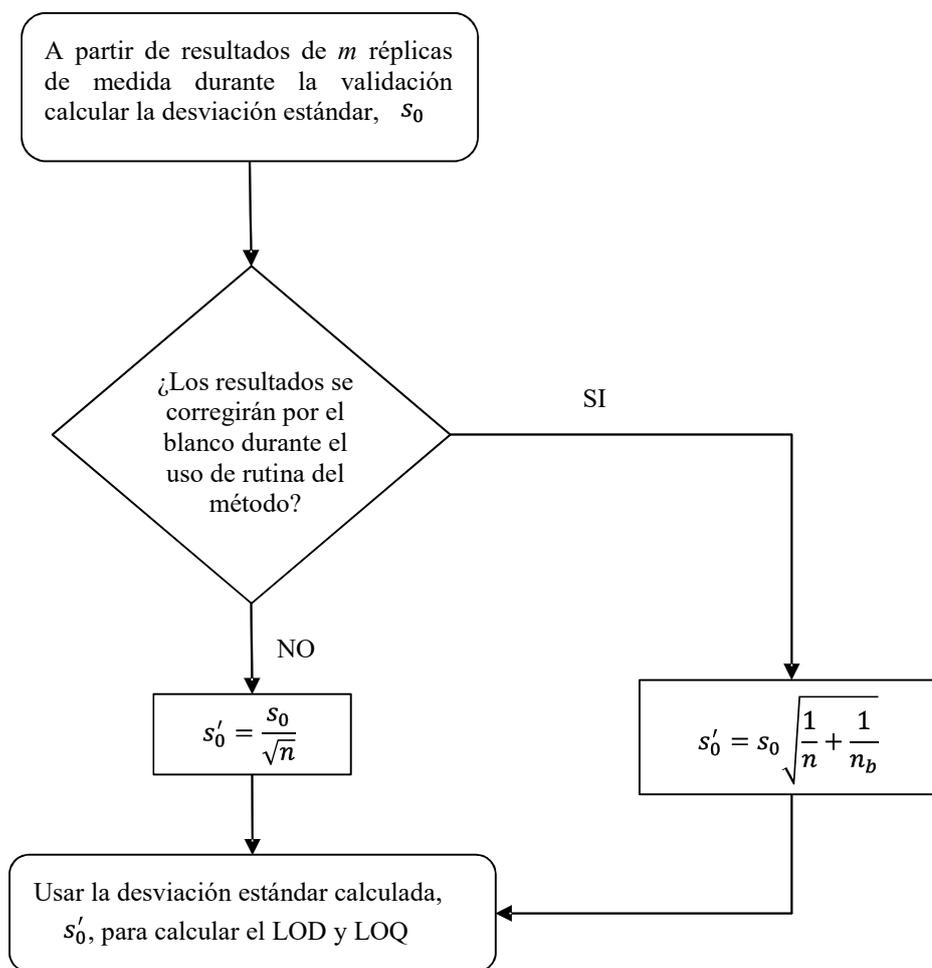
Ejemplo 3 – Un ejercicio de validación se basa en el análisis de una muestra blanco. Diez (m) mediciones independientes de una muestra blanco se realizan bajo condiciones de repetibilidad. El promedio de estos resultados tiene un valor de 2 mg kg⁻¹ y una desviación estándar s_0 de 1 mg kg⁻¹.

Caso 1- El procedimiento de medición establece que las muestras de ensayo deberían ser medidas una vez ($n=1$) y que los resultados deberían corregirse por el resultado de una única muestra de blanco de muestra ($n_b=1$). En una serie de mediciones cada corrida consiste de una única réplica de muestras de rutina y una (n_b) muestra blanco. Entonces, la desviación estándar para calcular LOD/LOQ, según la Figura 2 es igual a:

$$s'_0 = s_0 \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{1}{n_b}} = 1 \sqrt{\frac{1}{1} + \frac{1}{1}} = 1\sqrt{2} = 1,4 \text{ mg kg}^{-1}$$

Caso 2 – El procedimiento de medición establece que las muestras de ensayo deberían ser analizadas por duplicado ($n=2$) y también que la muestra blanco debería ser analizada por duplicado. En una serie de mediciones cada serie consiste en duplicados ($n=2$) de muestras de rutina y dos (n_b) muestras blanco. La concentración obtenida para las muestras de rutina es corregida sustrayendo el valor promedio de los dos blancos de muestra. Entonces, la desviación estándar para calcular LOD/LOQ, según la Figura 2 es igual a:

$$s'_0 = s_0 \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{1}{n_b}} = 1 \sqrt{\frac{1}{2} + \frac{1}{2}} = 1 \text{ mg kg}^{-1}$$



s_0 es la desviación estándar estimada de m resultados individuales en o cerca de concentración cero.

s'_0 es la desviación estándar usada para calcular LOD y LOQ.

n es el número de réplicas de observación promediadas cuando se informan resultados donde cada réplica es obtenida siguiendo enteramente el procedimiento de medición.

n_b es el número de observaciones de blanco promediadas cuando se calcula la corrección del blanco de acuerdo al procedimiento de medición.

Figura 2 – Cálculo de la desviación estándar, s'_0 para ser usada en la estimación de LOD y LOQ. El diagrama de flujo comienza con una desviación estándar experimental, s_0 calculada a partir de los resultados de réplicas de medición bajo condiciones de repetibilidad en una muestra de concentración cercana a cero, ya sea sin corrección de blanco o con una corrección de blanco aplicada a todos los resultados según lo especificado por el método. Esta corrección de blanco puede basarse en una observación de blanco o en un promedio de varias observaciones de blanco.

6.2.3 Estimación del LOD

Con el propósito de la validación, normalmente es suficiente con proveer un valor aproximado del LOD, es decir, el nivel en el cual la detección del analito se vuelve problemática. Para este propósito será normalmente suficiente el enfoque de “3s” mostrado en la Referencia Rápida 2.

Cuando el trabajo ofrezca soporte para el cumplimiento reglamentario o de especificaciones, se requiere un enfoque más exacto, en particular teniendo en cuenta los grados de libertad asociados con s_0 . Esto se describe en detalle por la IUPAC [49] y otros [50, 51]. Cuando el valor crítico y/o el LOD son usados para tomar decisiones, la precisión debería ser monitoreada y los límites pueden necesitar ser recalculados de vez en cuando. Diferentes sectores y/o reglamentaciones pueden usar diferentes enfoques en cuanto a la estimación del LOD. Se recomienda que la convención usada se detalle cuando se cite un límite de detección. En ausencia de alguna línea sectorial para la estimación de LOD, los enfoques dados en la Referencia Rápida 2 pueden ser usados como tendencias generales.

Referencia Rápida 2 – Límite de detección (LOD)

Qué hacer	Cuántas veces	Qué calcular a partir de los datos	Comentarios
a) Medidas replicadas de muestras blanco, es decir matrices que no contengan cantidades detectables del analito. o Medidas replicadas de la muestra de ensayo con una baja concentración del analito.	10	Calcule la desviación estándar, s_0 de los resultados. Calcule s'_0 a partir de s_0 siguiendo el diagrama de flujo de la Figura 2. Calcule LOD como $LOD = 3 \times s'_0$.	
b) Medidas replicadas de blancos de reactivo. o Medidas replicadas de blancos de reactivos fortificados con una baja concentración del analito.	10	Calcule la desviación estándar, s_0 de los resultados. Calcule s'_0 desde s_0 siguiendo el diagrama de flujo de la Figura 2. Calcule LOD como $LOD = 3 \times s'_0$.	El método b) es aceptable cuando no es posible obtener muestras blanco o muestras de ensayo con una baja concentración. Cuando estos blancos de reactivo no son sometidos a todo el procedimiento de medición, y se presentan directamente al instrumento, los cálculos resultarán en el LOD del instrumento.
NOTAS			
1) Para algunas técnicas analíticas, p. ej. Cromatografía, puede ser necesario fortificar muestras de ensayo conteniendo una concentración demasiado baja o blancos de reactivo, para obtener una desviación estándar diferente de cero. 2) El procedimiento de medición debería ser repetido enteramente para cada determinación. 3) La desviación estándar se expresa en unidades de concentración. Cuando la desviación estándar se expresa en el ámbito de la señal, el LOD es la concentración correspondiente a la señal del blanco $y_B + 3 \times s'_0$. 4) Un ejemplo corto de cálculo de LOD en el ámbito de la señal se proporciona también en la Referencia [5].			

6.2.4 Estimación del LOQ

El LOQ es el mínimo nivel de analito que puede ser determinado con desempeño aceptable. “Desempeño aceptable” es considerado de diversas formas por diferentes guías incluyendo precisión y veracidad, o incertidumbre de medición [52]. En la práctica, sin embargo, el LOQ se calcula de acuerdo a la mayoría de las convenciones como la concentración del analito correspondiente a la desviación estándar obtenida (s'_0) a niveles bajos multiplicada por un factor, k_Q . El valor por defecto para k_Q es 10 según IUPAC [49] y si la desviación estándar es aproximadamente constante a bajas concentraciones este multiplicador corresponde a una desviación estándar relativa (RSD) de 10 %. Los multiplicadores 5 y 6 también ha sido usados ocasionalmente lo cual corresponde a valores de RSD de 20 % y 17 % respectivamente [53, 54]. Véase más en la Referencia [8] y la Referencia Rápida 3.

Referencia Rápida 3 – Límite de cuantificación (LOQ)

Qué hacer	Cuántas veces	Qué calcular a partir de los datos	Comentarios
a) Medidas replicadas de muestras blanco, es decir matrices que no contengan cantidades detectables del analito. o Medidas replicadas de la muestra de ensayo con una baja concentración del analito.	10	Calcule la desviación estándar, s_0 de los resultados. Calcule s'_0 a partir de s_0 siguiendo el diagrama de flujo de la Figura 2. Calcule LOD como $LOQ = k_Q \times s'_0$.	El valor del multiplicador k_Q usualmente es 10, pero se usan comúnmente otros valores como 5 o 6 (basado en criterios de “adecuación al uso”).
b) Medidas replicadas de blancos de reactivo. o Medidas replicadas de blancos de reactivos fortificados con una baja concentración del analito.	10	Calcule la desviación estándar, s_0 de los resultados. Calcule s'_0 desde s_0 siguiendo el diagrama de flujo de la Figura 2. Calcule LOD como $LOQ = k_Q \times s'_0$.	El método b) es aceptable cuando no es posible obtener muestras blanco o muestras de ensayo con una baja concentración. Cuando estos blancos de reactivo no son sometidos a través de todo el procedimiento de medición, y se presentan directamente al instrumento, los cálculos resultarán en el LOQ del instrumento.
NOTAS			
<ol style="list-style-type: none"> 1) Para algunas técnicas analíticas, p. ej. Cromatografía, puede ser necesario enriquecer muestras de ensayo conteniendo una concentración demasiado baja o blancos de reactivo, para obtener una desviación estándar diferente de cero. 2) El procedimiento de medición debería ser repetido enteramente para cada determinación. 3) La desviación estándar se expresa en unidades de concentración. 			

6.2.5 Procedimientos alternativos

Las secciones previas han descrito un método general para estimar LOD y LOQ, basado en la desviación estándar de resultados en concentraciones cercanas a cero, obtenidas en condiciones de repetibilidad. Este enfoque es aplicado extensamente pero hay disponibles procedimientos alternativos en otras normas y protocolos.

En algunos casos, p. ej. cuando los valores de blanco difieren significativamente entre días, las condiciones de precisión intermedia son preferidas a las condiciones de repetibilidad. Por ejemplo, si se encuentran disponibles resultados de control de calidad para muestras de ensayo a niveles de concentración bajos, la desviación estándar de estos resultados puede ser utilizadas en la estimación de LOD y LOQ. Cuando la desviación estándar usada para calcular LOD y LOQ se obtiene bajo condiciones de precisión intermedia, el ajuste para contemplar la

corrección del blanco mostrado en la Figura 2 no es necesario. Por lo tanto la desviación estándar experimental obtenida a partir del control de calidad interno es igual a la desviación estándar s'_0 a utilizar para calcular LOD y LOQ. La ISO 11843-2 [46] describe como el LOD de un instrumento puede ser obtenido directamente de una curva de calibración.

6.2.5.1 Fiabilidad de la estimación del LOD y LOQ

Debería tenerse en cuenta que aún con las 10 réplicas indicadas en la Referencia Rápida 2 y la Referencia Rápida 3, las estimaciones de la desviación estándar son inherentemente variables. Por consiguiente, la estimación de LOD/LOQ obtenida durante la validación debería ser tomada como un valor indicativo. Esto será suficiente si se necesita una estimación de LOD/LOQ simplemente para demostrar que las concentraciones de las muestras se encontrarán muy por encima del LOD/LOQ. En

casos donde se espere que las muestras de laboratorio contengan concentraciones bajas del analito, el LOD/LOQ debería ser monitoreado regularmente.

6.2.6 Capacidad de detección para un análisis cualitativo

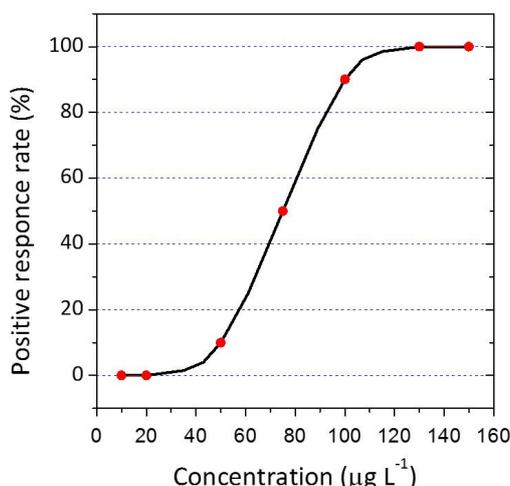
Un análisis cualitativo (Anexo D) involucra la identificación o clasificación de sustancias y es efectivamente una respuesta “sí/”no” a una concentración de corte dada para un analito [55]. Para métodos cualitativos, la precisión no puede ser expresada como una desviación estándar o desviación estándar relativa, pero

puede ser expresada como tasas de verdaderos y falsos positivos y negativos.

En un estudio de validación la concentración de corte puede ser determinada estableciendo las tasas de falsos positivos y negativos en una cantidad de niveles por encima y por debajo de la concentración de corte esperada. El límite de corte, las tasas de falsos negativos son bajas para concentraciones por encima del límite – con una probabilidad establecida, p. ej. 5%. Durante la validación, se evalúa el límite de corte propuesto en el procedimiento documento. (Véase Ejemplo 4 y Referencia Rápida 4).

Ejemplo 4 – Determinación de la concentración de corte para un método cualitativo con un nivel de corte indicado igual a 100 µg L⁻¹. Se registraron diez observaciones a cada nivel. A partir de la curva que representa la fracción (en %) de resultados positivos frente a la concentración, fue posible determinar, por inspección, la concentración umbral a la cual el ensayo se vuelve poco fiable. Con un criterio < 5 % de resultados falso negativos, la concentración de corte está entre 100 y 130 µg L⁻¹

C (µg L ⁻¹)	No. de resultados positivos/negativos
150	10/0
130	10/0
100	9/1
75	5/5
50	1/9
20	0/10
10	0/10



Referencia Rápida 4 – Límite de detección (LOD) para análisis cualitativos

Qué hacer	Cuántas veces	Qué calcular/determinar a partir de los datos
Mida en orden aleatorio, muestras blanco enriquecidas con el analito en un intervalo de niveles de concentración.	10	Se debería construir una curva de respuesta de porcentajes de resultados positivos o negativos frente a la concentración, de la cual será posible determinar, por inspección, la concentración umbral a la cual el ensayo se vuelve poco confiable.

6.3 Intervalo de trabajo

6.3.1 Definición

El ‘intervalo de trabajo’* es el intervalo en el cual el método proporciona resultados con una incertidumbre aceptable. El extremo inferior del intervalo de trabajo está determinado por el límite de cuantificación, LOQ. El extremo superior del intervalo de trabajo está definido por las concentraciones a las cuales se observan anomalías significativas en la sensibilidad analítica. Un ejemplo de esto es el efecto meseta a altos valores de absorbancia en la espectroscopia UV/VIS.

6.3.2 Consideraciones para el estudio de validación

El intervalo de trabajo del método que se va a validar, debe indicarse en el alcance del procedimiento documentado (ver A.5 del anexo A). Durante la validación, es necesario confirmar que el método puede utilizarse en este intervalo. Para evaluar el intervalo de trabajo, el laboratorio tiene que considerar tanto la linealidad del método como el procedimiento de calibración propuesto indicado en el método.

6.3.3 Intervalo de trabajo del método y del instrumento

Muchos métodos se basan en que la muestra de ensayo recibida en el laboratorio (la muestra de laboratorio) sea procesada (digerida, extraída, diluida) antes de que pueda presentarse al instrumento de medición y se registre una señal. En estos casos, hay dos intervalos de trabajo. El intervalo de trabajo del método, dado en el alcance del método (por ejemplo, sección A.5 del anexo A), se relaciona con la concentración de la muestra de laboratorio. Se expresa, por ejemplo, en mg kg⁻¹ para una muestra de ensayo sólida. El intervalo de trabajo del instrumento está definido en términos de la concentración de una muestra de ensayo procesada presentada al instrumento para su medición (por ejemplo, mg L⁻¹ en una solución después de extraer la muestra). En la Figura 3A se da un ejemplo del intervalo de trabajo de un instrumento en el que se representa la señal del instrumento en función de las concentraciones de los patrones de calibración. En la Figura 3B se da un ejemplo del intervalo de trabajo de un método en el que se grafican la concentración medida en función de las concentraciones conocidas de la muestra de

ensayo. La concentración medida es el resultado obtenido aplicando el procedimiento de medición (incluyendo cualquier preparación de muestras) usando el instrumento calibrado de acuerdo con el método documentado.

Durante la validación, se debe evaluar tanto el intervalo de trabajo del instrumento como el del método. Los datos sobre el intervalo de trabajo a menudo se generan durante el desarrollo del método. En tales casos, será suficiente incluir estos datos en el informe de validación.

6.3.4 Evaluación del intervalo de trabajo del instrumento

Entre el LOQ y el extremo superior del intervalo de trabajo del instrumento, la respuesta de éste sigue una relación conocida, por ejemplo, lineal, curvilínea, etc. Durante la validación, es necesario i) confirmar esta relación, ii) demostrar que el intervalo de trabajo del instrumento es compatible con el rango indicado en el alcance del método, y iii) verificar que el procedimiento de calibración instrumental propuesto (un solo punto, bracketing, multipunto) sea adecuado.

Para evaluar el intervalo de trabajo del instrumento y confirmar su aptitud para el uso, se deberían estudiar patrones de calibración con un alcance de concentración que sobrepase el rango de concentración esperado en $\pm 10\%$ o incluso $\pm 20\%$ y graficar las señales (ver paso 1 de la Referencia Rápida 5). Para un rango de 1 a 100 mg L⁻¹, $\pm 20\%$ indica de 0,8 a 120 mg L⁻¹. Se deben espaciar uniformemente las concentraciones seleccionadas en el rango. La evaluación inicial del intervalo de trabajo se realiza mediante una inspección visual de la curva de respuesta. El siguiente paso es confirmar la relación entre la concentración y la respuesta del instrumento revisando las estadísticas de regresión y el gráfico de residuales del modelo elegido (por ejemplo, lineal, cuadrático) (ver paso 2 de la Referencia Rápida 5). La evaluación también puede incluir medidas estadísticas especiales, tales como pruebas de la ‘bondad del ajuste’ [56, 57]. A partir de la curva de respuesta y las estadísticas de apoyo obtenidas en el intervalo de trabajo del instrumento, el analista puede evaluar si el procedimiento de calibración propuesto indicado en el método es apropiado. Además, esto se determina evaluando el intervalo de trabajo del método.

* El término del VIM [7] es ‘intervalo de medición’ o ‘intervalo de trabajo’

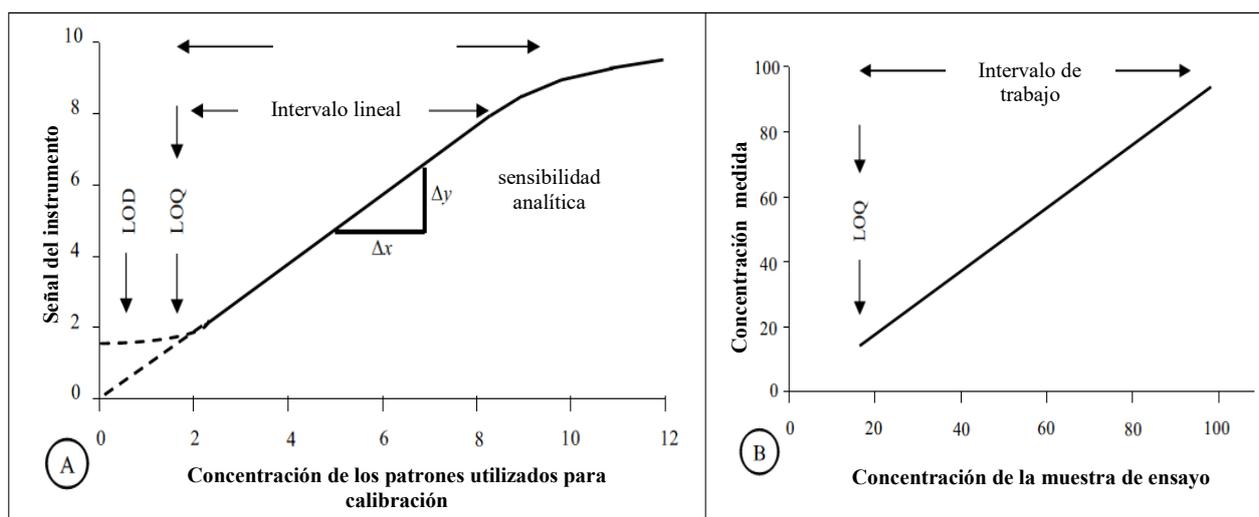


Figura 3 – A) Ejemplo típico de una curva de respuesta obtenida con un método instrumental. Se identifican las características de desempeño ‘intervalo de trabajo’, ‘intervalo lineal’, ‘sensibilidad analítica’, ‘LOD’ y ‘LOQ’. B) Ejemplo típico de una curva obtenida con un procedimiento de medición en el que se representa la concentración medida en función de la concentración de la muestra de ensayo.

6.3.5 Evaluación del intervalo de trabajo del método

Para evaluar el intervalo de trabajo del método, 1) muestras con concentraciones conocidas y blancos de muestra deberían estar disponibles; 2) las muestras utilizadas deberían someterse al procedimiento de medición completo; 3) las concentraciones de las diferentes muestras deben cubrir, de preferencia, todo el rango de interés; y 4) el instrumento debería haber sido calibrado de acuerdo con el procedimiento de calibración propuesto. El resultado de medición para cada muestra de ensayo se calcula de acuerdo con el procedimiento documentado (ver el paso 3 en la Referencia Rápida 5). Estos valores se grafican en el eje y en función de las concentraciones conocidas de las muestras (eje x) como en la Figura 3B.

El intervalo de trabajo y la linealidad del método se evalúan mediante una inspección visual del gráfico, con el apoyo de estadísticas y un gráfico de residuales de una regresión lineal.

La evaluación del intervalo de trabajo se sustentará con datos de estudios de precisión y sesgo (ver Secciones 6.5.2 y 6.6.2.1), siempre que estos estudios cubran las concentraciones en todo el intervalo de trabajo del método.

Se debe establecer el intervalo de trabajo del método para cada matriz cubierta en el alcance del método. Esto se debe a que las interferencias pueden producir respuestas no lineales, y la capacidad del método para extraer/recuperar el analito puede variar con la matriz de la muestra.

Referencia Rápida 5 – Intervalo de trabajo e intervalo lineal

Qué hacer	Cuántas veces	Qué calcular a partir de los datos	Qué hacer
1) Medir un blanco más patrones de calibración, a 6-10 concentraciones espaciadas uniformemente en el rango de interés.	1	Graficar la respuesta (eje y) en función de la concentración (eje x). Examinar visualmente para identificar el rango lineal aproximado y los límites superior e inferior del intervalo de trabajo del instrumento. Luego pasa a 2)	Esto dará una confirmación visual de si el intervalo de trabajo del instrumento es lineal o no. Nota: Cuando la señal no es directamente proporcional a la concentración, por ejemplo, al trabajar con pH u otros electrodos de ión selectivo o métodos inmunométricos, se requiere una transformación de los valores medidos antes de que se pueda evaluar la linealidad.
2) Medir un blanco más patrones de calibración, 2-3 veces a 6-10 concentraciones espaciadas uniformemente en el <i>rango lineal</i> .	1	Graficar la respuesta (eje y) en función de la concentración (eje x). Examinar visualmente para determinar valores atípicos que quizá no se reflejen en la regresión. Calcular las estadísticas de regresión apropiadas. Calcular y graficar los residuales (la diferencia entre el valor observado de y y el valor calculado de y pronosticado por la línea recta, para cada valor de x). La distribución aleatoria de residuales en torno a cero confirma la linealidad. Las tendencias sistemáticas indican la no linealidad o un cambio de varianza con el nivel.	Esta etapa es necesaria para ensayar un intervalo de trabajo, que se considere lineal y especialmente en el que el método utilice una calibración de dos puntos. Si la desviación estándar es proporcional a la concentración, entonces considerar utilizar un cálculo de regresión ponderado en vez de una regresión lineal no ponderada simple. Es peligroso eliminar un valor atípico sin verificarlo primero utilizando otras mediciones a concentraciones cercanas. En ciertas circunstancias, para la calibración de instrumentos, puede ser mejor tratar de ajustar una curva no lineal a los datos. En ese caso, se debe incrementar el número de muestras. Por lo general, no se recomienda el uso de funciones superiores a las cuadráticas.
3) Calibrar el instrumento de acuerdo con el procedimiento de calibración propuesto. Medir, de acuerdo con el método documentado, un blanco más materiales de referencia o blancos de muestra adicionados 2-3 veces a 6-10 concentraciones espaciadas uniformemente en el rango de interés.	1	Graficar la concentración medida (eje y) en función de la concentración de las muestras de ensayo (eje x). Examinar visualmente para identificar el rango lineal aproximado y los límites superior e inferior del intervalo de trabajo. Calcular las estadísticas de regresión apropiadas. Calcular y graficar los residuales (la diferencia entre el valor observado de y y el valor calculado de y pronosticado por la línea recta, para cada valor de x). La distribución aleatoria de residuales en torno a cero confirma la linealidad. Las tendencias sistemáticas indican la no linealidad.	Este paso se requiere para evaluar si el rango propuesto del instrumento y el procedimiento de calibración son aptos para el uso. Si pueden encontrarse datos en estudios de precisión y sesgo que cubren el rango de interés, quizás no se requiera otro estudio del intervalo de trabajo del método.

6.4 Sensibilidad analítica

6.4.1 Definición

La sensibilidad analítica es la variación de la respuesta del instrumento que corresponde a una variación de la magnitud medida (por ejemplo, una concentración de analito), es decir, el gradiente de la curva de respuesta [7, 18]. Se recomienda utilizar el adjetivo ‘analítica’ para evitar confusión con el término ‘sensibilidad de diagnóstico’ utilizado en laboratorios de medicina [43]. A veces se utiliza el término ‘sensibilidad’ para referirse al límite de detección, pero se desaconseja este uso en el VIM.

6.4.2 Aplicaciones

La sensibilidad analítica no es una característica de desempeño muy importante. Sin embargo, existen al menos dos aplicaciones útiles:

1. A veces se conoce la sensibilidad analítica teórica. Muchos electrodos de ión selectivo muestran un comportamiento Nernstiano, i.e., se espera que la señal de un electrodo de vidrio que funcione bien, varíe en 59 mV/pH.
2. En sistemas de medición espectrofotométrica, se puede predecir la absorbancia a partir de la

ley de Beer-Lambert. Esto puede utilizarse como una verificación del desempeño del instrumento, y a veces las normas exigen realizar dichas verificaciones [58].

6.5 Veracidad

6.5.1 Terminología para describir la calidad de medición

En esta Guía, utilizamos las tres características de desempeño relacionadas, veracidad, precisión e incertidumbre para describir la calidad de los resultados obtenidos con un método. Sin embargo, los científicos con frecuencia utilizan diferentes conceptos, tales como tipos de error (errores aleatorios, sistemáticos y groseros), exactitud (veracidad y precisión) e incertidumbre. Algunos de estos conceptos tienen un significado cualitativo y otros son cuantitativos. Con los años, los términos así como las definiciones han cambiado, y se han introducido nuevos términos. Además, sectores diferentes siguen prefiriendo términos diferentes, todo lo cual conduce a mucha confusión. La Figura 4 ilustra las relaciones entre los términos y se dan mayores detalles en el VIM [7] y la Guía Eurachem sobre terminología [8].

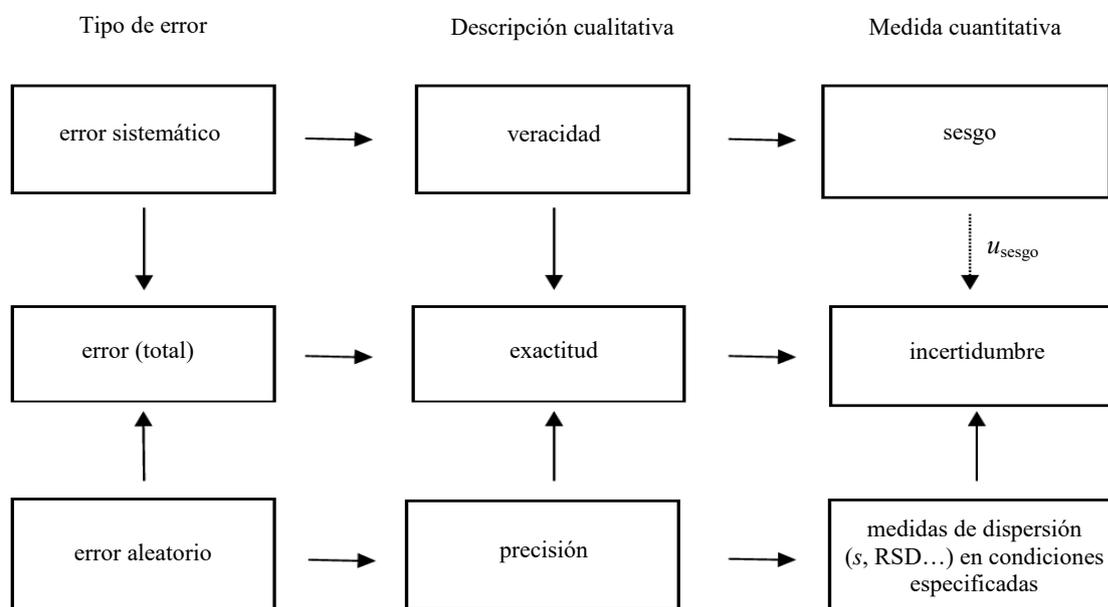


Figura 4 – Ilustración de las relaciones entre algunos conceptos fundamentales utilizados para describir la calidad de los resultados de medición (basada en el trabajo de Menditto et al. [59]). Una evaluación de la incertidumbre de acuerdo con GUM [21] supone una corrección por sesgo conocido y que la incertidumbre de la corrección del sesgo u_{sesgo} está incluida en la declaración final de incertidumbre. Esto se infiere de la flecha punteada que aparece debajo del recuadro 'sesgo'. Tanto el concepto de exactitud como el concepto de incertidumbre suponen que las mediciones se realizan de acuerdo con el procedimiento documentado y que no se incluyen los efectos de los 'errores groseros' (equivocaciones).

La ‘exactitud’ de medición expresa la proximidad de un único resultado a un valor de referencia * [29, 48]. (para una definición exacta, ver VIM 2.13). La validación de métodos trata de investigar la exactitud de los resultados evaluando los efectos sistemáticos y aleatorios sobre resultados individuales. Por lo tanto, normalmente la exactitud se estudia como dos componentes: ‘veracidad’ y ‘precisión’. Además, una expresión cada vez más común de exactitud es ‘incertidumbre de medición’, la cual proporciona un solo valor. La evaluación de veracidad se aborda a continuación, mientras que la precisión se trata en la Sección 6.6 y la incertidumbre, en la Sección 6.7.

‘Veracidad’ de medición es una expresión de la proximidad de la media de un número infinito de resultados (producidos con el método) a un valor de referencia. Puesto que no es posible realizar un número infinito de mediciones, no se puede medir la veracidad. Sin embargo, podemos realizar una evaluación práctica de la veracidad. Por lo general, esta evaluación se expresa cuantitativamente en términos de ‘sesgo’.

6.5.2 Determinación del sesgo

Una determinación práctica del sesgo se basa en la comparación de la media de los resultados (\bar{x}) del método candidato con un valor de referencia adecuado (x_{ref}). *Existen tres enfoques generales: a) análisis de materiales de referencia, b) experimentos de recuperación utilizando muestras adicionadas, y c) comparación con resultados obtenidos mediante otro método – ver Referencia Rápida 6. Los estudios de sesgo deben cubrir el alcance del método y, por lo tanto, pueden requerir el análisis de diferentes tipos de muestra y/o diferentes niveles de analito. Para lograr esto, se puede requerir una combinación de estos enfoques diferentes.

El sesgo puede expresarse en términos absolutos

$$b = \bar{x} - x_{\text{ref}} \quad (\text{Ec. 1})$$

o en términos relativos en porcentaje

$$b(\%) = \frac{\bar{x} - x_{\text{ref}}}{x_{\text{ref}}} \times 100 \quad (\text{Ec. 2})$$

o como recuperación relativa de adiciones

$$R'(\%) = \frac{\bar{x}' - \bar{x}}{x_{\text{adición}}} \times 100 \quad (\text{Ec. 3})$$

donde \bar{x}' es el valor medio de la muestra adicionada y $x_{\text{adición}}$ es la concentración añadida.

Sin embargo, en algunos sectores de medición analítica, también se utiliza la recuperación relativa (‘recuperación aparente’) en porcentaje [60].

$$R(\%) = \frac{\bar{x}}{x_{\text{ref}}} \times 100 \quad (\text{Ec. 4})$$

Para determinar el sesgo utilizando un MR, se determinan la media y la desviación estándar de una serie de mediciones repetidas y se comparan los resultados con el valor asignado para la propiedad del MR. El MR ideal es un material de referencia de matriz certificado con valores de las propiedades próximos a los de las muestras de ensayo de interés. Se acepta en general que los MRC proporcionan valores trazables [61, 62]. También es importante recordar que un determinado MR debería utilizarse únicamente para un fin durante un estudio de validación. Por ejemplo, un MR usado para la calibración no debería utilizarse para evaluar el sesgo.

En comparación con la amplia variedad de tipos de muestra y analitos que los laboratorios encuentran, la disponibilidad de MR es limitada, pero es importante que el material seleccionado sea *apropiado para su uso*. Puede ser necesario considerar cómo fue caracterizado el MR, por ejemplo, si el procedimiento de preparación de muestras utilizado durante la caracterización del material no tiene por objeto dar la concentración total del analito sino la cantidad extraída en ciertas condiciones. Para trabajos normativos, se debe utilizar un material certificado adecuado, idealmente de la misma matriz si está disponible. Para métodos usados en trabajos internos a largo plazo, se puede utilizar un material interno estable para monitorear el sesgo, pero se debería utilizar un MRC en la evaluación inicial.

En ausencia de MR adecuados, se pueden utilizar estudios de recuperación (experimentos con adiciones) para dar una indicación del nivel de sesgo probable. Los analitos pueden estar presentes en una variedad de formas en la muestra y a veces solo algunas de éstas son de interés para el analista. De este modo, el método puede diseñarse deliberadamente para determinar solo una determinada forma del analito. La incapacidad de un método para determinar todo o parte del analito presente puede reflejar un problema inherente al método.

* A veces al valor de referencia se le denomina ‘valor verdadero’ o ‘valor convencionalmente verdadero’.

Por consiguiente, es necesario evaluar la eficiencia del método para detectar todo el analito presente [60, 63].

Debido a que por lo general no se conoce la cantidad de un determinado analito que está presente en una porción de ensayo, es difícil estar seguro de cuánto éxito ha tenido el método para extraer el analito de la matriz de muestra. Una forma de determinar la eficiencia de extracción es adicionar porciones de ensayo con el analito en diferentes concentraciones, luego extraer las porciones de ensayo adicionadas y medir la concentración del analito. El problema inherente a este proceso es que el analito introducido de esta manera probablemente no estará tan fuertemente ligado como el que está naturalmente presente en la matriz de la porción de ensayo y, por lo tanto, la técnica dará una falsa impresión de una alta eficiencia de extracción.

Puede ser posible evaluar el sesgo comparando los resultados del método candidato con los obtenidos de un método alternativo. Pueden encontrarse dos tipos generales de método alternativo - un método de referencia o un método que actualmente se utiliza de manera rutinaria en el laboratorio. Un método de referencia tiene por objeto proporcionar un 'valor de referencia aceptado' para la propiedad medida y por lo general dará resultados con una menor incertidumbre que el método candidato. Un determinado tipo de método de referencia es un método primario.* El segundo caso se presenta cuando el propósito de la validación es demostrar que el método candidato da resultados que son equivalentes a los de un método existente. Aquí el objetivo es establecer que no hay un sesgo significativo en relación con los resultados generados por el método existente (aunque este método por sí mismo puede estar sesgado).

En ambos casos, se comparan los resultados del método candidato y del método alternativo, para la misma muestra o muestras. La muestra o muestras pueden ser MR internos, o simplemente muestras de ensayo típicas. La ventaja de este enfoque es que los materiales no tienen que ser MRC puesto que el método alternativo proporciona el valor de referencia. Por lo tanto, se puede poner a prueba el método en muestras 'reales' que sean representativas de las que el laboratorio encontrará de manera rutinaria.

* 'Método primario': un método que tiene las cualidades metrológicas más altas, cuyo funcionamiento se describe completamente y se entiende en términos de unidades SI y cuyos resultados son aceptados sin referencia a un patrón de la misma magnitud (CCQM). El término correspondiente del VIM (ver 2.8 en [7] es 'procedimiento de medición de referencia primario'

Referencia Rápida 6 – Veracidad

Qué hacer	Cuántas veces	Qué calcular a partir de los datos	Comentarios
a) Medir el MR utilizando el método candidato.	10	<p>Comparar el valor medio, \bar{x} con el valor de referencia x_{ref} para el MR. Calcular el sesgo, b, el sesgo relativo en porcentaje, b (%) o la recuperación relativa en porcentaje (recuperación aparente).</p> $b = \bar{x} - x_{\text{ref}}$ $b(\%) = \frac{\bar{x} - x_{\text{ref}}}{x_{\text{ref}}} \times 100$ $R(\%) = \frac{\bar{x}}{x_{\text{ref}}} \times 100$	Da una medida del sesgo tomando en cuenta los efectos del sesgo del método y del laboratorio.
b) Medir blancos de matriz o muestras de ensayo no adicionadas y adicionadas con el analito de interés en un intervalo de concentraciones.	10	<p>Comparar la diferencia entre el valor medio de adiciones \bar{x}' y el valor medio \bar{x}, con la concentración añadida $x_{\text{adición}}$. Calcular la recuperación relativa de adiciones R' (%) a las diferentes concentraciones:</p> $R'(\%) = \frac{\bar{x}' - \bar{x}}{x_{\text{adición}}} \times 100$	<p>Se deben comparar las muestras adicionadas con la misma muestra no adicionada para evaluar la recuperación neta de la adición.</p> <p>Las recuperaciones a partir de muestras adicionadas o blancos de matriz generalmente serán mejores que para muestras de rutina en las cuales el analito está más fuertemente ligado.</p>
c) Medir el MR/muestra de ensayo utilizando el método candidato y el método alternativo.	10	<p>c) Medir el MR/muestra de ensayo utilizando el método candidato y el método alternativo</p> $b = \bar{x} - \bar{x}_{\text{ref}}$ $b(\%) = \frac{\bar{x} - \bar{x}_{\text{ref}}}{\bar{x}_{\text{ref}}} \times 100$ $R(\%) = \frac{\bar{x}}{x_{\text{ref}}} \times 100$	<p>Da una medida del sesgo en relación con el método alternativo. El método alternativo puede ser un método de referencia o, si la intención es sustituir un método por otro y hace falta demostrar el desempeño equivalente, un método utilizado actualmente en el laboratorio.</p> <p>El método alternativo por sí mismo puede estar sesgado, en cuyo caso el experimento no dará una medición absoluta de la veracidad.</p>
NOTA El sesgo puede variar con la matriz y el nivel de concentración, lo cual significa que el número de matrices y niveles de concentración que se va a examinar, debe indicarse en el plan de validación.			

6.5.3 Interpretación de las mediciones de sesgo

La Figura 5 muestra dos componentes del sesgo, denominados aquí 'sesgo del método' y 'sesgo del laboratorio'.

El sesgo del método surge de los errores sistemáticos inherentes a éste, independientemente del laboratorio que lo utilice. El sesgo del laboratorio surge de errores sistemáticos adicionales específicos del laboratorio y la interpretación que éste hace del método. En forma aislada, un laboratorio solo puede calcular el sesgo combinado (total) a partir de estas dos fuentes. Sin embargo, en la verificación del sesgo, es importante conocer las convenciones correspondientes al propósito específico. Por ejemplo, para algunas aplicaciones en alimentos, los límites normativos se establecen en términos de los resultados obtenidos del método normalizado empírico ('definido operativamente') especificado. El sesgo del método para procedimientos de medición 'empíricos' es, por definición, cero. En ese caso, el sesgo que surge únicamente del método específico (ver Figura 5 se ignora, y la comparabilidad metrológica con otros laboratorios que utilizan el mismo método, es la principal preocupación. En esta situación, el laboratorio debería determinar idealmente el sesgo utilizando un material de referencia certificado con el método específico, normativo o empírico, que es objeto de investigación, en cuyo caso se aplican las directivas habituales para la verificación e interpretación del sesgo. Cuando no está disponible dicho material, o para agregar más información, el laboratorio puede

utilizar materiales alternativos, pero debería tener cuidado de considerar cualquier diferencia conocida entre el método objeto de investigación y el método o métodos utilizados para obtener el valor de referencia cuando interpreta los resultados.

Para cumplir con un determinado requisito analítico, el mismo analito puede medirse utilizando varios instrumentos de medición diferentes en muchos puntos dentro de la misma organización. En este caso, numerosas y complejas fuentes de sesgo surgen dentro de la organización. En esta situación común y compleja, la organización puede establecer procedimientos para calcular una incertidumbre representativa que cubra todos los puntos/instrumentos para cada aplicación. Ésta debería utilizar, de preferencia, material que tenga las mismas propiedades, incluyendo la matriz de muestra, para las muestras que se pretende medir. El análisis de componentes de varianza puede utilizarse para identificar las principales causas de la variación que contribuyen a la incertidumbre de medición general, permitiendo acciones de seguimiento para reducir las diferencias en la organización.

Sin embargo, para la mayoría de los propósitos, la aceptabilidad del sesgo debería decidirse sobre la base del sesgo general medido en relación con MR, materiales adicionados o métodos de referencia apropiados, tomando en cuenta la precisión del método y cualquier incertidumbre de los valores de referencia, y la exactitud requerida para el uso final. Se recomiendan las pruebas de significación estadística [64, 65].

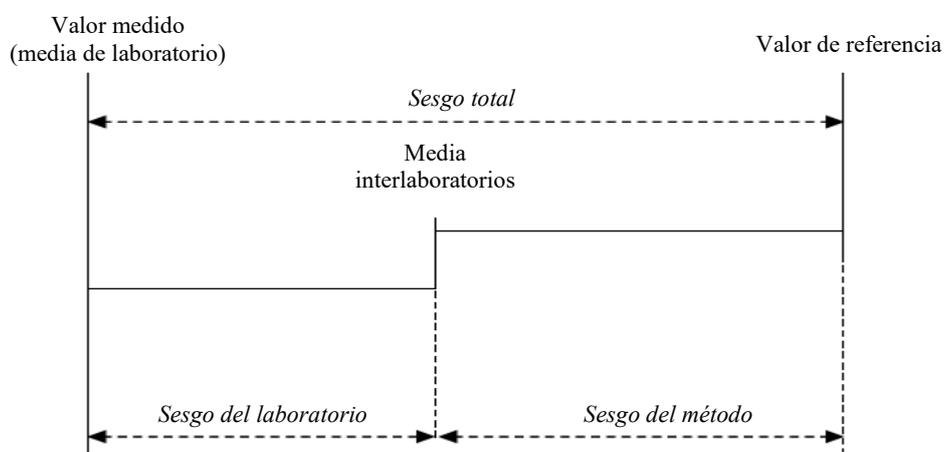


Figura 5 – El sesgo medido total está compuesto del sesgo del método y el sesgo del laboratorio. Nota: Aquí se muestra el sesgo de laboratorio y el sesgo del método actuando en la misma dirección. En realidad, no siempre es este el caso.

6.6 Precisión

6.6.1 Repetición

La repetición es esencial para obtener estimaciones fiables de características de desempeño del método, tales como la precisión y el sesgo. Los experimentos que implican análisis repetidos deben ser diseñados para tener en cuenta todas las variaciones en las condiciones operativas que se pueden esperar durante el uso rutinario del método. El objetivo debería ser determinar la variabilidad típica y no la variabilidad mínima.

6.6.2 Condiciones de precisión

Precisión (precisión de la medida) es una medida de cuán cerca están los resultados entre sí [7, 29]. Por lo general, se expresa mediante parámetros estadísticos que describen la propagación de los resultados, típicamente la desviación estándar (o desviación estándar relativa), calculada a partir de los resultados obtenidos mediante la realización de mediciones repetidas en un material adecuado en condiciones específicas. La decisión sobre las "condiciones específicas" es un aspecto importante de la evaluación de la precisión de la medida - las condiciones determinan el tipo de estimación obtenida de la precisión.

“Repetibilidad de medición” y “reproducibilidad de medición” representan las dos medidas de precisión que se pueden obtener. La documentación de métodos estandarizados (por ejemplo de ISO) incluirá normalmente tanto la repetibilidad y reproducibilidad de datos, donde sean aplicables.

Repetibilidad, supone dar la más pequeña variación en los resultados, es una medida de la variabilidad en los resultados cuando una medición se lleva a cabo por un solo analista utilizando el mismo equipo en un corto plazo de tiempo.*

Reproducibilidad, supone dar la mayor variación en los resultados, es una medida de la variabilidad en los resultados entre laboratorios.†

* La repetibilidad se refiere algunas veces como precisión “dentro de la serie de medida”, “dentro de un lote” o “intra-ensayo”.

† En validación, reproducibilidad se refiere a la variación entre laboratorios utilizando el mismo método. Reproducibilidad también puede referirse a la variación observada entre laboratorios utilizando diferentes métodos, pero con la intención de medir la misma magnitud [7].

Entre estos dos extremos, “la precisión intermedia (de medida)” ofrece una estimación de la variación en los resultados cuando las mediciones se realizan en un solo laboratorio, pero en condiciones que son más variables que las condiciones de repetibilidad. Las condiciones exactas utilizadas deben establecerse en cada caso. El objetivo es obtener una estimación de la precisión que refleje todas las fuentes de variación que se producirán en un solo laboratorio en condiciones de rutina (diferentes analistas, períodos de tiempo prolongado, diferentes piezas de equipos etc.).‡

6.6.2.1 Estimación de la precisión – aspectos generales

La precisión es generalmente dependiente de la concentración de analito, y así debe determinarse en una serie de concentraciones a través del intervalo de interés. Esto podría incluir una concentración particular de interés (tal como un límite reglamentario) más concentraciones a los límites del intervalo de medición. Si procede, la relación entre la precisión y la concentración de analito debe estar establecida. En los casos en que la concentración medida está muy por encima del límite de detección, la precisión que se determina, es a menudo proporcional a la concentración de analito. En tales casos, puede ser más apropiado expresar la precisión como una desviación estándar relativa ya que ésta es aproximadamente constante a lo largo del rango de interés.

Para los métodos cualitativos, la precisión no se puede expresar como una desviación estándar o desviación estándar relativa, pero puede expresarse como tasas verdaderos y falsos positivos (y negativos) [55] (ver la Sección 6.2.6).

La evaluación de la precisión requiere la realización de mediciones repetidas en materiales adecuados. Los materiales deben ser representativos de las muestras de ensayo en términos de la matriz y la concentración de analito, la homogeneidad y la estabilidad, pero no necesitan ser MRC. Las réplicas también deben ser independientes, esto es, todo el proceso de medición, incluyendo los pasos de preparación de muestras, debe repetirse. El número mínimo especificado de repeticiones

‡ La precisión intermedia hace referencia a veces a "la reproducibilidad dentro del laboratorio", "variación entre series de medida", "variación entre lotes" o "variación inter-ensayo".

varía con los diferentes protocolos, pero está típicamente entre 6 y 15 para cada material utilizado en el estudio.

Debe tenerse en cuenta que es difícil de estimar una desviación estándar fiable a partir de conjuntos de datos con pocas repeticiones. De ser admisible, los valores calculados a partir de varias pequeñas series de mediciones repetidas se pueden combinar (agrupar) para obtener estimaciones con suficientes grados de libertad.

Algunos diseños experimentales, analizados mediante análisis de varianza (ANOVA), son una forma eficiente de obtener estimaciones de repetibilidad y precisión intermedia con un número adecuado de grados de libertad (ver la Sección 6.6.4 y el Anexo C para una explicación más detallada de este método). Ver la Referencia Rápida 7 para obtener información sobre los experimentos para evaluar la precisión.

6.6.3 Límites de precisión

La desviación estándar s es útil para calcular un "límite de precisión" [29, 48]. Esto permite al analista decidir si existe una diferencia significativa, a un determinado nivel de confianza, entre los resultados de los análisis por duplicado de una muestra obtenida en condiciones especificadas. El límite de repetibilidad (r) se calcula como sigue:

$$r = \sqrt{2} \times t \times s_r \quad (\text{Ec. 5})$$

donde el factor $\sqrt{2}$ refleja la diferencia entre dos mediciones, t es la t de Student a dos colas para un determinado número de grados de libertad (que se refiere a la estimación del s_r) y en el nivel requerido de confianza. Para un número relativamente grande de grados de libertad, $t \approx 2$ a nivel de confianza del 95%, por lo que el límite de repetibilidad se suele aproximar como:

$$r = 2.8 \times s_r \quad (\text{Ec. 6})$$

El límite de precisión intermedia y el límite de reproducibilidad (R) se calculan de manera similar, sustituyendo s_r con s_I y s_R , respectivamente.

La documentación de métodos estandarizados (por ejemplo, de la ISO) normalmente incluirá datos tanto para el límite de repetibilidad como para el límite de reproducibilidad, según el caso.

6.6.4 Determinación simultánea de la repetibilidad y la precisión intermedia

Los enfoques para la determinación simultánea de la repetibilidad y de la precisión intermedia se describen en la norma ISO 5725-3 [29]. Además, un diseño basado en las Directrices armonizadas para la validación de métodos de análisis en un solo laboratorio [12] ofrece la posibilidad de determinar la repetibilidad y precisión intermedia de un único estudio. Las submuestras del material de ensayo seleccionado se analizan por replicado en condiciones de repetibilidad a través de un número de diferentes series de medida, con una variación máxima en condiciones entre las series de medida (diferentes días, diferentes analistas, diferentes equipos, etc.). Mediante ANOVA de un factor [5, 6], la repetibilidad puede calcularse como la precisión dentro del grupo, mientras que la precisión intermedia se obtiene como la raíz cuadrada de la suma de los cuadrados de la precisión dentro del grupo y entre grupos. Este tipo de diseño puede proporcionar una forma eficaz de obtener suficientes grados de libertad para las estimaciones de la repetibilidad y precisión entre los grupos. Por ejemplo, 8 grupos de 2 repeticiones conducen a 8 y 7 grados de libertad para la estimación de la repetibilidad y precisión entre series, respectivamente. Ver más información en el Anexo C.

Referencia Rápida 7 – Repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad

Qué hacer	Cuántas veces	Qué calcular/determinar de los datos	Comentarios
Medir materiales de referencia (MR), muestras excedentes de ensayo o blancos de muestra adicionados a diversas concentraciones en todo el intervalo de trabajo. La repetibilidad y la precisión intermedia se pueden determinar a partir de estudios por separado (véase a) y b) o simultáneamente en un solo estudio (ver c).			
a) Mismo equipo y mismo analista, mismo laboratorio, corto plazo de tiempo.	6-15 réplicas para cada material.	Determinar la desviación estándar (s) de los resultados para cada material.	Estimar la desviación estándar de repetibilidad s_r para cada material. ^a
b) Analistas y equipos diferentes, mismo laboratorio, plazo prolongado de tiempo.	6-15 réplicas para cada material.	Determinar la desviación estándar (s) de los resultados para cada material.	Estimar la desviación estándar de la precisión intermedia s_I para cada material.
c) Analistas y equipos diferentes, mismo laboratorio, plazo prolongado de tiempo.	6-15 grupos de medidas duplicadas ^b obtenidas bajo condiciones de repetibilidad en días/equipos diferentes para cada material.	Calcular la desviación estándar de repetibilidad de los resultados de ANOVA para cada material. Calcular la desviación estándar entre grupos de los resultados de ANOVA y combinarla con la desviación estándar de repetibilidad para cada material.	Estimar la desviación estándar de repetibilidad s_r para cada material. Estimar la desviación estándar de la precisión intermedia s_I para cada material.
d) Analistas y equipos diferentes, laboratorios diferentes, plazo prolongado de tiempo.	6-15 grupos de medidas duplicadas ^b obtenidas bajo condiciones de repetibilidad en diferentes laboratorios para cada material.	Calcular la desviación estándar de repetibilidad de los resultados de ANOVA para cada material. Calcular la desviación estándar entre laboratorios de los resultados de ANOVA y combinarla con la desviación estándar de repetibilidad para cada material.	Estimar la desviación estándar de repetibilidad s_r para cada material. Estimar la desviación estándar de reproducibilidad s_R para cada material. Esto requiere una comparación especial entre laboratorios ('ensayo colaborativo').
^a Una desviación estándar de repetibilidad también se puede estimar al reunir varios conjuntos pequeños de datos, por ejemplo, $n = 2$, de diferentes días.			
^b Las mediciones duplicadas dentro de cada grupo proporcionará un número equilibrado de grados de libertad para las estimaciones las desviaciones estándar inter y entre grupos. Aumentando el número de repeticiones por grupo aumentará el número de grados de libertad asociados con la estimación de la repetibilidad.			

6.7 Incertidumbre de medida

Un tratamiento detallado sobre la incertidumbre de medida está fuera del alcance de esta Guía, pero información más completa se puede encontrar en las referencias [21, 22]. La incertidumbre es un intervalo asociado con un resultado de medida que expresa el intervalo de valores que razonablemente pueden atribuirse a la cantidad que se está midiendo. Una estimación de la incertidumbre debe tener en cuenta *todos los efectos reconocidos* que operan en el resultado. Las incertidumbres asociadas con cada efecto se combinan de acuerdo con procedimientos bien establecidos.

Se describen varios enfoques para obtener una estimación de la incertidumbre de los resultados de las mediciones químicas [22, 66, 67, 68]. Estos tienen en cuenta:

- la precisión a largo plazo global del método (es decir, la precisión intermedia o la reproducibilidad);
- el sesgo y su incertidumbre, incluyendo la incertidumbre estadística que corresponde a las medidas de sesgo, y la incertidumbre en el valor de referencia [69, 70, 71, 72, 73];
- la calibración de equipos. Las incertidumbres asociadas con la calibración de equipos tales como balanzas, termómetros, pipetas y frascos son a menudo insignificamente pequeña en comparación con la precisión global y la incertidumbre en el sesgo. Si esto se puede verificar entonces las incertidumbres de calibración no necesitan ser incluidas en la estimación de la incertidumbre;
- cualquier efecto significativo que opera además de lo anterior. Por ejemplo, los intervalos de temperatura o el tiempo permitidos por el método no pueden ejecutarse plenamente en los estudios de validación, y sus efectos pueden necesitar ser añadidos. Tales efectos pueden ser útilmente cuantificados mediante estudios de robustez (ver Sección 6.8), o estudios relacionados que establecen el tamaño de un efecto dado en el resultado.

Cuando la contribución de los efectos individuales es importante, por ejemplo, en los laboratorios de calibración, será necesario tener en cuenta las contribuciones individuales de todos los efectos individuales por separado.

Tener en cuenta que, sujetos a consideración adicional de los efectos fuera del alcance de un

estudio colaborativo, la desviación estándar de reproducibilidad configura una estimación de trabajo de la incertidumbre típica combinada siempre que el sesgo del laboratorio, medido en los materiales aplicables, es pequeño con respecto a la desviación estándar de la reproducibilidad, la repetibilidad interna es comparable con la repetibilidad del método estándar, y la precisión intermedia del laboratorio no es mayor que la desviación estándar de la reproducibilidad publicada [67].

6.8 Robustez

6.8.1 Definición

La "robustez" de un procedimiento analítico es "una medida de su capacidad para permanecer no afectado por pequeñas variaciones premeditadas de los parámetros del método. La robustez proporciona una indicación de la fiabilidad del método durante su uso normal" [13].

6.8.2 Ensayo de robustez

En cualquier método habrá ciertas etapas que, si no se realizan con suficientemente cuidado, tendrán un efecto significativo en el desempeño del método e incluso puede resultar que el método no funciona en absoluto. Estas etapas deberían ser identificadas, por lo general como parte del desarrollo del método, y si es posible, su influencia en el desempeño del método evaluado utilizando una "prueba de resistencia" ("prueba de robustez"). La AOAC ha definido este término y describe una técnica establecida para la forma de llevar a cabo una prueba de este tipo utilizando un diseño experimental Plackett-Burman [74].

Un "ensayo de robustez" implica hacer cambios deliberados en el método, e investigar el efecto subsiguiente en el desempeño.* A continuación, es posible identificar las variables en el método que tienen el efecto más significativo y garantizar que, cuando se utiliza el método, están controladas estrictamente. Donde hay una necesidad de perfeccionar más el método, las mejoras se pueden probablemente hacer mediante la concentración en aquellas partes del método conocidas por ser críticas.

robustez de un procedimiento debe ser establecida para los métodos de desarrollo interno, métodos adaptados de la literatura

* El efecto en el mesurando se estudia normalmente, pero una alternativa es investigar el efecto sobre un parámetro experimental, por ejemplo, la resolución de los picos en un cromatograma.

científica y los métodos publicados por organismos de normalización utilizados fuera del alcance especificado en el método estándar. Cuando se utilizan métodos publicados por organismos de normalización dentro del alcance de aplicación del método, la robustez por lo general ha sido estudiada como parte del proceso de normalización. Por lo tanto un estudio de

robustez se encuentra en la mayoría de los casos no necesariamente en el nivel de un solo laboratorio. La información sobre la robustez se debe indicar en el procedimiento del laboratorio en forma de los límites de tolerancia establecidos para los parámetros experimentales críticos (Ver Ejemplo 5 and Referencia Rápida 8).

Ejemplo 5 – Citas de la ISO 11732 [58]. Las instrucciones indican la criticidad de algunos parámetros experimentales.

- NH_4Cl secado hasta masa constante a 105 ± 2 °C.
- Las cantidades dadas se pueden reducir (p.ej.: un décimo).
- Almacenada en una botella de plástico (polietileno) a la temperatura de la sala, la solución es estable alrededor de 1 mes.
- La absorbancia de la solución debería ser 0,3 – 0,5.
- Degasificar y purificar la solución..., llenarla en el depósito de reactivo y dejarla reposar durante al menos 2 horas.
- Esta solución puede ser almacenada en frigorífico a lo sumo una semana.
- Recipientes de vidrio, polialquenos o politetrafluoretileno (PTFE) son adecuados para recoger muestra.
- En casos excepcionales, la muestra puede almacenarse hasta dos semanas, siempre que la muestra haya sido filtrada por membrana después de la acidificación.

Referencia Rápida 8 – Robustez

Qué hacer	Cuántas veces	Qué calcular/determinar de los datos	Comentarios
<p>Identificar las variables que podrían tener un efecto significativo en el desempeño del método.</p> <p>Establecer experimentos (analizando MR o muestras de ensayo) para supervisar el efecto en los resultados de la medida cambiando de forma sistemática las variables.</p>	<p>Evaluado más efectivamente utilizando diseños de experimentos. Por ejemplo: 7 parámetros se pueden estudiar en 8 experimentos utilizando un diseño de experimentos Plackett-Burman [74].</p>	<p>Determinar el efecto de cada cambio de condición en los resultados de la medida.</p> <p>Clasificar las variables según el mayor efecto sobre el desempeño del método.</p> <p>Realizar pruebas de significación para determinar si los efectos observados son estadísticamente significativos.</p>	<p>Diseñar el control de calidad o modificar el método para controlar las variables críticas, por ejemplo, indicando los límites de tolerancia adecuados en el procedimiento operativo estándar.</p>

7 Uso de métodos validados

Cuando no se utiliza un método propio, ya sea un método desarrollado en otro lugar dentro del laboratorio, un método publicado, o incluso un método normalizado o reglamentario, hay dos cuestiones que deben tenerse en cuenta.

En primer lugar, ¿la validación existente es adecuada para el uso previsto del método o es necesario realizar alguna actividad adicional? Cabe señalar que, además de la cantidad de información proporcionada sobre el desempeño del método, la fiabilidad de las fuentes de datos de validación es también un problema. Los datos obtenidos en estudios colaborativos o por organizaciones de normalización reconocidas generalmente se consideran fiables, siendo menos aquellos datos publicados en la literatura científica o proporcionados por los fabricantes de equipos y / o reactivos. En segundo lugar, siendo adecuados los datos de validación disponibles ¿está el laboratorio en disposición de verificar el desempeño declarado para el método? (ver Sección 2.2). ¿Son los equipos e instalaciones disponibles adecuadas? Si el método ha sido validado exhaustivamente en todas las condiciones extremas de operación, entonces la incorporación de un nuevo analista autorizado probablemente funcionará satisfactoriamente. Sin embargo, esto debería revisarse previamente. Habitualmente, es suficiente para probar la competencia del analista obtener la repetibilidad indicada y comprobar si hay algún sesgo, siempre que el método normalizado se emplee dentro de su alcance. Esto se trata con más detalle a continuación.

Los métodos normalizados se desarrollan generalmente por algún tipo de estudio colaborativo y los organismos de normalización que los dirigen, tienen, con frecuencia, expertos en estadística para ayudar a asegurar que los estudios de validación estén correctamente diseñados, realizados y evaluados. La norma ISO 5725 [29] describe un modelo en el que deben basarse las comparaciones de métodos entre laboratorios, a fin de proporcionar información fiable sobre el desempeño del método. Este modelo se aplica cada vez más, pero no todos los métodos normalizados han sido sometidos al mismo. Sería arriesgado suponer que todos los métodos normalizados se han validado adecuadamente y es responsabilidad del analista, comprobar si la información proporcionada sobre el desempeño del método es adecuada.

Del mismo modo, a menudo se asume que los métodos estándar se pueden utilizar directamente de la estantería y los datos de desempeño publicados lograrse de inmediato por quien utiliza el método. Esto no es una suposición segura. Incluso aquellos que están familiarizados o expertos en el campo particular de la química cubierto por el método tendrán que practicar antes de ser plenamente competentes.

Al utilizar métodos validados (o para el caso cualquier método) se recomiendan las siguientes reglas para asegurar que se logra un desempeño aceptable.

1. En primer lugar, el analista debe estar completamente familiarizado con un nuevo método antes de usarlo por primera vez. Lo ideal sería que el método primero se presentara al analista por alguien ya experto en su uso. Inicialmente el analista debe utilizarlo entonces bajo estrecha supervisión. El nivel de supervisión se relajará hasta que el analista se considera suficientemente competente para 'ir en solitario'. Por ejemplo la competencia podría establecerse en términos de la capacidad del analista para alcanzar los niveles de desempeño establecidos en el método, como la repetibilidad, límite de detección, etc. Esto es típico de la forma en que alguien podría estar capacitado para utilizar un nuevo método y los procedimientos de entrenamiento del laboratorio se pueden, con frecuencia, diseñar de esta manera con medidas objetivas en lugar de probar la competencia a intervalos durante el entrenamiento. En cualquier caso, los analistas deben haber leído el método y familiarizarse con la teoría detrás de la medición, ensayando mentalmente las distintas etapas, identificando los puntos donde se pueden tomar descansos, y las partes del proceso en el que los analistas están sometidos a trabajo continuo. ¿Cuándo tienen que estar preparados los reactivos, qué tan estables son una vez que están preparados? ¿Necesitan estar preparados de antemano? Un error típico es pasar varias horas preparando una serie de muestras y luego encontrarse que la preparación del reactivo necesario para la siguiente etapa del trabajo consiste en una síntesis complicada, mientras tanto las muestras en sí mismas pueden degradarse.

2. En segundo lugar, se ha de hacer una evaluación de cuántas muestras pueden ser manipuladas convenientemente a la vez. Es mejor analizar una pocas muestras que tratar de analizar un gran número y tener que repetir la mayoría de ellas.
3. Por último, asegurarse de que todo lo necesario para ejecutar el método está disponible antes de iniciar el trabajo. Esto implica reunir el equipo adecuado, reactivos y

patrones (con alguna preparación auxiliar), y tal vez la reserva de espacio en las campanas de extracción, etc.

Si es necesario adaptar o cambiar el método validado por alguien más, entonces será necesaria la revalidación correspondiente. En función de su naturaleza, los cambios pueden también hacer que los datos de la validación originales sean irrelevantes.

8 Empleo de los datos de validación para el diseño del programa de control de calidad

8.1 Introducción

‘Aseguramiento de la Calidad’ (AC) y ‘Control de Calidad’ (CC) son términos cuyo significado varía según el contexto. De acuerdo con ISO, el aseguramiento de la calidad se ocupa de las actividades que el laboratorio realiza para garantizar que se cumplen los requerimientos de calidad aplicables, en tanto que el control de calidad describe las medidas individuales utilizadas para que los requerimientos se cumplan de manera efectiva [9].

La validación de un método proporciona una idea de la capacidad y limitación del método usado de manera habitual, en tanto que el método está bajo control. Para comprobar que el método permanece bajo control, es decir, se comporta de la manera esperada, deben ponerse en marcha controles específicos. Durante el proceso de validación el método se utiliza sobre muestras con concentración conocida. Una vez que es utilizado rutinariamente, las muestras evaluadas son de concentración desconocida. Puede aplicarse un CC interno adecuado incluyendo medidas de muestras de control estables, permitiendo al analista discernir si la variedad de respuestas obtenidas se debe a la variabilidad de las muestras ensayadas o a cambios inesperados y no deseados en el comportamiento del método. En la práctica estas muestras de valor conocido deben incluirse en cada lote de Muestras como parte del proceso de control de calidad. Las comprobaciones dependerán de la naturaleza, criticidad y frecuencia de los análisis, el tamaño del lote, el grado de automatización o la complejidad del ensayo, así como de la experiencia adquirida durante los procesos de desarrollo y validación. El control de calidad puede plantearse de diversas formas, bien por mecanismos propios del laboratorio (interno) o en relación con otros laboratorios (externo).

8.2 Control de calidad interno

El CC interno supone la aplicación de procedimientos por parte del personal del laboratorio para la supervisión continuada de las operaciones y resultados de medida con el fin de decidir si estos resultados son suficientemente fiables como para ser liberados [18, 75]. Esto incluye análisis duplicados de Muestras estables, blancos, soluciones patrón o materiales similares a los utilizados en la calibración instrumental,

muestras adicionales, muestras ciegas y muestras de CC [76]. Se recomienda el uso de gráficos de control para monitorizar los resultados de CC [76, 77]. El CC puesto en marcha debe demostrar que es suficiente para asegurar la validez de los resultados. Se pueden emplear distintos tipos de control de calidad en función del tipo de seguimiento que se quiera realizar sobre las variaciones del proceso. Las muestras de CC analizadas a intervalos dentro del lote analítico proporcionan información sobre deriva en el sistema; el uso de varios tipos de blanco indicará cuál es la contribución de la señal instrumental además de la propia del analito; los análisis duplicados dan información sobre la repetibilidad.

Las muestras de CC son muestras especiales que, para un periodo de tiempo determinado, son suficientemente estables y homogéneas para dar el mismo Resultado (sujeto a la variación aleatoria del funcionamiento del método), y que están disponibles en cantidad suficiente para repetir los análisis a lo largo del tiempo. Durante este periodo se puede supervisar la precisión intermedia del método, representando los resultados en un gráfico de control. Previamente se han configurado los límites en el gráfico (de manera habitual los ‘límites de aviso’ se definen como $\pm 2s$ el valor de \bar{x} media, y los ‘límites de acción’ se fijan como $\pm 3s$ el valor de la media). Siempre que los valores de CC cumplan las reglas establecidas, el CC se considera satisfactorio. En tanto que el valor de la muestra de CC es aceptable, se asume que son fiables los resultados de las muestras de rutina del mismo lote. Debe comprobarse lo antes posible la validez del resultado de CC para minimizar, en caso de problemas, los esfuerzos realizados y la fiabilidad de los resultados de las muestras de rutina.

Durante la validación del método se obtienen estimaciones iniciales de diferentes medidas de precisión. Para establecer límites más objetivos en los gráficos de control, las medidas deben reflejar la adecuación al uso del método. Por lo tanto, las medidas realizadas durante la validación deberán tener en cuenta todas las posibles variaciones operativas: diferentes analistas, temperatura del laboratorio, etc. Si no es así, los valores obtenidos para la desviación

estándar serán anormalmente bajos, afectando a los límites establecidos para los gráficos de control e imposibilitando su cumplimiento durante los ensayos de rutina. Por esta razón, se recomienda revisar los límites fijados transcurrido un año de la puesta en funcionamiento del método o una vez se dispone de un número suficiente de resultados de control [76].

El uso de varios tipos de blancos permite al analista asegurar que los cálculos asociados al valor del analito pueden ser corregidos para eliminar contribuciones no atribuibles al analito mismo. El análisis de duplicados sobre Muestras de rutina permite comprobar si se han producido cambios en la precisión del método, lo que podría afectar negativamente al resultado [78]. Las muestras duplicadas analizadas consecutivamente permiten comprobar la repetibilidad.

El análisis repetido de muestras ciegas es una forma efectiva de comprobar la precisión. Consiste en la colocación, dentro del lote, de réplicas de una misma muestra. Su nombre se debe a que el analista desconoce su existencia dentro del lote, de modo que este no tiene ideas preconcebidas sobre la relación de los resultados para esas réplicas.

El uso de patrones o materiales similares a los empleados en la calibración instrumental, colocados a lo largo del lote analítico, permite que la respuesta del proceso analítico sea estable.

Es responsabilidad de la dirección del laboratorio establecer y justificar un nivel apropiado de control de calidad, basado en la evaluación de riesgos, teniendo en cuenta la fiabilidad del Método, la criticidad de los ensayos y la posibilidad de repetir los ensayos en caso de ser necesario. De forma general, se acepta un nivel de CC interno del 5% sobre muestras de rutina, es decir, que una de cada 20 muestras analizadas debería ser una muestra de CC. Sin embargo, para métodos de rutina más robustos, con gran cantidad de Muestras, puede ser razonable un nivel de control más bajo. Para procedimientos más complejos, es usual un nivel de control del 20%, e incluso puede ser necesario alcanzar el 50%. Para análisis con escasa frecuencia de realización, debería realizarse una validación completa en cada caso. Generalmente, esto supone usar un material de referencia (MR) de concentración certificada o conocida, seguido de análisis de duplicado de la muestra y una muestra enriquecida (muestra a la que se ha adicionado

de forma intencionada un valor conocido de concentración). Los análisis realizados con mayor frecuencia deberían contemplar el uso habitual muestras de control y su monitorización en gráficos de control.

8.3 Control de calidad externo

La participación regular en Ensayos de Aptitud (PT), conocido también como Evaluación Externa de la Calidad (EQA), es una forma reconocida para realizar el seguimiento del desempeño del método frente a los requisitos internos y en comparación con laboratorios similares. Los PT permiten identificar tanto variaciones entre laboratorios (reproducibilidad) como errores sistemáticos* (sesgo).

Los programas PT y otros tipos de comparación entre laboratorios se aceptan como un instrumento útil para realizar el seguimiento del grado de equivalencia de resultados analíticos a nivel nacional e internacional. Las Entidades de Acreditación reconocen la utilidad de estos programas y animan a los laboratorios a participar en los mismos como parte esencial de sus sistemas de gestión [79]. Es importante monitorizar los resultados de los PT como parte de los procedimientos de CC y tomar las acciones oportunas cuando sea necesario.

En algunos casos, las Entidades de Acreditación pueden establecer la participación en programas PT particulares como requisito para la acreditación. La utilidad de los PT es tanta como el valor de sus propios esquemas†. Los requisitos de competencia técnica para los organizadores de programas PT se describen en la norma ISO/IEC 17043 [80]. Además, la Guía Eurachem [81] incluye información práctica sobre la selección, uso e interpretación de programas PT. En la base de datos EPTIS puede encontrarse información sobre gran número de programas (www.eptis.bam.de). Sin embargo, puede que no existan programas totalmente adecuados para análisis en campos emergentes o en aplicaciones raras. Estas y otras limitaciones han sido consideradas en un nuevo documento guía [82] y que lleva a los laboratorios acreditados a establecer una estrategia para su participación en programas PT.

* N.T.: En este caso hay que tener en cuenta como se ha obtenido el valor asignado.

† N.T.: El laboratorio puede verse obligado a participar en un ejercicio irrelevante para él (diferencia de intervalos de trabajo, matrices, etc.) o tener que participar en PT de escasa calidad por ser los únicos disponibles en el mercado.

9 Documentación de los métodos validados

9.1 Desde el borrador a la versión final

El método objeto de la validación se utiliza inicialmente con un procedimiento que debe considerarse un borrador hasta que se aprueba el informe de validación. Una vez completada la validación es importante documentar el procedimiento analítico de modo que el método sea usado sin ambigüedades. Hay varias razones que lo justifican.

- Las diferentes evaluaciones del método realizadas durante el proceso de validación suponen, que en uso rutinario, el método se emplea siempre de la misma manera. De no ser así, el desempeño actual no se corresponde con los datos obtenidos en la validación. De este modo, la documentación debe limitar la posibilidad de introducir cambios accidentalmente.
- La documentación también es necesaria para fines relacionados con auditorías y evaluaciones, así como por requisitos contractuales o reglamentarios.
- Un método documentado adecuadamente permite su uso de una manera consistente. Ya que la calidad de la documentación tiene un efecto directo en el uso del método, es probable que tenga influencia en la precisión e incertidumbre de las medidas. De hecho, esta contribución puede hacer que el método sea inoperante. Cualquier error documental debe resolverse previo a obtener una estimación razonable de la incertidumbre.

9.2 Recomendaciones

9.2.1 Comprobación de las indicaciones

No es fácil documentar un método correctamente. La información debe aparecer más o menos en el orden en que se espera que el usuario la necesite. Un error común es asumir que todo el mundo va a entender la mecánica del método igual que la persona que lo ha desarrollado y documentado. Esta presunción puede resultar peligrosa. Una manera útil de comprobar la utilidad de la documentación es proponer su uso a una persona con conocimientos técnicos solicitando su aplicación tal cual se ha escrito. Si el resultado es favorable, el método debe difundirse y permitirá obtener resultados fiables. De lo contrario, es necesario

elaborar un nuevo documento con mayor detalle y menor ambigüedad.

9.2.2 Recomendaciones en normas

Existen normas que proporcionan orientación sobre la información a tener en cuenta a la hora de documentar un método. Desde el punto de vista químico, quizás la más útil sea la serie ISO 78, ya que establece los principios aplicables al diseño y redacción de métodos de análisis químico descritos en las normas internacionales (los organismos de normalización producen, validan y documentan gran número de métodos cada año, necesitando un enfoque coherente para la elaboración de normas en beneficio de sus propios comités técnicos). La ISO 78-2 [83] propone una forma de documentar los métodos químicos generales. El Anexo A incluye un ejemplo de diseño. Las normas sugieren un orden lógico de redacción con propuestas de apartados y el contenido de cada uno de ellos. Al usar estas normas el lector no debe olvidar el equilibrio entre la flexibilidad y la coherencia de la redacción. Si bien resulta deseable que todos los métodos cuenten con el mismo formato, hay que considerar que no todos requieren el mismo nivel de detalle, por lo que en algunos casos pueden omitirse alguna de las recomendaciones dadas.

9.2.3 Control de los documentos

Un laboratorio que documenta sus métodos puede desarrollar un 'estilo propio'. Además de presentar la información relevante de una forma lógica y fácil de usar, puede distribuir el trabajo de elaboración entre varios miembros del laboratorio y asignar una única persona para la revisión de la coherencia de todos los borradores elaborados.

Los métodos documentados son una parte importante del sistema de gestión de calidad del laboratorio, y deben estar sujetos a un nivel de control adecuado. El objeto de este control es asegurar que solo se usan aquellos métodos que previamente han sido autorizados para ello. Por lo tanto, como parte del proceso de documentación, los métodos deben contar con información que permita saber si el método ha sido autorizado, su número de versión y la fecha de edición, el autor, número de copias distribuidas y cualquier restricción a ser reproducido.

En ocasiones los métodos deben ser revisados. Así por ejemplo, el avance tecnológico puede permitir mejorar el método. El control de los documentos permite retirar los documentos obsoletos y distribuir los revisados. Este proceso se simplifica con el empleo de aplicaciones

informáticas específicas. Los cambios deberían hacerse solo por personal autorizado, lo que puede gestionarse mediante niveles apropiados de acceso a las aplicaciones informáticas, por ejemplo con perfiles de ‘solo lectura’ o ‘escritura’.

10 Implicaciones de los datos de validación para el cálculo e informe de resultados

Es importante que el analista sea capaz de convertir los datos, generados durante el análisis de muestras utilizando métodos validados, en resultados que contribuyan directamente a la resolución del problema del cliente. Las características de desempeño establecidas durante el proceso de validación ayudan en este aspecto. Se pueden utilizar los datos de repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad para establecer si las diferencias encontradas al analizar las muestras son significativas. Los controles de calidad basados en los datos de validación se pueden utilizar para confirmar que el método está bajo control y que produce resultados válidos. La estimación de la incertidumbre de la medida permite expresar los resultados como un intervalo de valores con un nivel de confianza aceptado.

Es importante que el analista tenga acceso a los datos de validación que puedan ser utilizados para apoyar la validez de los resultados. Otra cuestión es si esa información se hace llegar o no al cliente. Frecuentemente, el cliente no tendrá las habilidades técnicas para apreciar el significado de los datos. En esas circunstancias, lo más apropiado es que los datos estén disponibles bajo petición.

Asuntos tales como la validación del método, la variabilidad e incertidumbre de la medida deben ser tratados con cuidado en determinadas circunstancias, por ejemplo, en contextos forenses. Es mejor ser receptivo a la existencia de la incertidumbre asociada a las medidas y encontrarse preparado para justificar las

decisiones tomadas a la luz del conocimiento de dicha incertidumbre.

Hay que tener precaución al utilizar un resultado analítico y su incertidumbre asociada para pretender decidir si la partida original de la que se ha obtenido la muestra cumple con una especificación o límite [84]. Esta decisión no debe ser responsabilidad del analista, si bien es él quien será requerido para aportar asesoramiento técnico para ayudar en el proceso de toma de decisiones.

Al informar de los resultados, el analista debe decidir si corregir los errores de éstos que han sido detectados o presentar los resultados sin corregir, pero admitiendo la existencia del sesgo.

Debería prestarse atención al informar de los resultados como 'no detectado'. En sí misma, esta afirmación no es informativa y debería ir acompañada por una explicación de cuál es el límite de detección en ese caso. En ocasiones, es apropiado reseñar un valor numérico, aunque este sea inferior al límite de detección aparente. Las autoridades pueden, en ocasiones, solicitar que se indique el valor del límite de cuantificación.

Si se solicita declarar la incertidumbre con el resultado, sería adecuado dar el valor de la incertidumbre expandida, aplicando el factor de cobertura adecuado. Por ejemplo, un factor de 2 para un intervalo con un nivel de confianza de, aproximadamente, el 95 %. Para mayor información sobre cómo informar de la incertidumbre, consulte la Sección 9 de la Guía Eurachem/CITAC [22].

Anexo A – Protocolo para la documentación del Método

En la Sección 9 de la Guía se analiza la documentación adecuada del método. Se incluye el formato siguiente como referencia para un diseño adecuado. Este formato está basado en la norma ISO 78-2 [83], pero contiene algunos consejos adicionales sobre calibración, control de calidad y control de documentos. El Anexo A es, únicamente, orientativo y debería adaptarse a cualquier requerimiento especial.

A.1 Preámbulo

A.1.1 Actualización y resumen de la revisión

Esta sección tiene un doble objetivo. En primer lugar, está concebida para hacer posible realizar cambios mínimos en el texto del método, sin necesidad de realizar una revisión completa y reedición del método. En segundo lugar, se recomienda que la adecuación al propósito de cada método se revise periódicamente y que el resumen se emplee como registro de que así se ha hecho. El resumen se situará en la parte delantera del método, justo en el interior de la cubierta frontal.

A.1.2 Actualizaciones

Cualquier modificación por escrito del texto del método debería ser aceptada siempre y cuando las modificaciones se registren en la tabla inferior (se aceptan las entradas manuscritas) y sean debidamente autorizadas. Se sobreentiende que la autorización respalde el hecho de que se han investigado las consecuencias de los cambios en la validación del método, sin haber causado problemas, y que se han realizado los cambios en todas las copias del método.

#	Sección	Índole de la corrección	Fecha	Autorización
1 (p. ej.)	3.4	Modificación del flujo a 1,2 ml min ⁻¹	2/8/96	DGH

A.1.3 Revisión

La fecha en la que se ha observado que el método está en uso ha de estar, siempre, comprendida entre las fechas de la *revisión* y la de la *próxima revisión*, según se muestra en la tabla.

Fecha de revisión	Resultado de la revisión	Fecha de la próxima revisión	Autorización

A.2 Introducción

La introducción se utilizará, si es necesario, para presentar información, como por ejemplo, comentarios sobre el contenido técnico del procedimiento o la necesidad de su preparación. Si se requiere información sobre los antecedentes del método, ésta debería incluirse, preferentemente, en esta cláusula.

A.3 Título

En el título se indicarán los tipos de muestra a los que se aplica el método de prueba, el analito o la característica a determinar, así como el principio en el que se basa dicha determinación. Debería limitarse, en la medida de lo posible, a la información que se indica a continuación. Formato preferido:

Determinación de A {*analito o mensurando*} (en presencia de B{*interferencia*}) en C{*matriz*} utilizando D {*principio*}.

A.4 Precauciones

Debe prestarse atención a cualquier riesgo y describir las precauciones detalladas para evitarlo. Si bien se deben detallar las precauciones en las secciones relevantes, la existencia de riesgos y su prevención deben mencionarse aquí. Proporcione las advertencias adecuadas para cualquiera de los riesgos relacionados con:

- manipulación de las muestras;
- manipulación o preparación de disolventes, reactivos, patrones u otros materiales;
- operación de equipos;
- requerimiento de lugares de manipulación especiales, p. ej., campanas extractoras de humos;
- consecuencias de los experimentos a escala (límites de explosión).

A.5 Alcance

Esta sección permite al potencial usuario observar rápidamente si el método puede ser apropiado para la aplicación deseada o si existe alguna limitación. Se deben contemplar los siguientes aspectos:

- una descripción del problema subyacente (por qué se necesita el método);
- el analito o mensurando que pueden ser determinados con el método;
- la forma en la que se determina el analito o analitos –especiación, total/disponible, etc.;
- la matriz o las matrices de la muestra que contienen al analito a determinar;
- el intervalo de trabajo (intervalo de medida) en el que se puede aplicar el método. Debe hacer referencia a propiedades como concentraciones en la muestra de laboratorio;
- interferencias conocidas que limitan o impiden el uso del método;
- la técnica instrumental utilizada en el método;
- la cantidad mínima de muestra.

El sector alimenticio [35] utiliza el término ‘aplicabilidad’ como sinónimo de alcance y lo define como “los analitos, matrices y concentraciones para las cuáles el método de análisis se puede usar satisfactoriamente”.

A.6 Referencias (normativas)

Este apartado proporcionará una lista de aquellos documentos que son necesarios para la aplicación del método. Los documentos que únicamente han servido para la preparación del método, deben ser referenciados en la bibliografía, al final del documento.

A.7 Definiciones

Proporcione cualquier definición de los términos usados en el texto, que pueda ser necesaria para la comprensión completa del mismo. Utilice las definiciones ISO siempre que sea posible. Cite las fuentes. Se pueden incluir aquí las estructuras analíticas, si lo considera relevante.

A.8 Principio

Describa las etapas esenciales del método, el principio en el que se basan las técnicas analíticas empleadas. Puede ser útil mostrar un diagrama de flujo o de causa-efecto. Se debe escribir esta sección de manera que se pueda tener, a simple vista, un resumen del funcionamiento del método. Incluya la explicación del método de cálculo. Siempre que sea necesario, y con el fin de aclarar el método de trabajo o los cálculos realizados, incluya los detalles de cualquier reacción química pertinente (esto puede ser importante, p. ej., cuando sea necesaria la derivatización o en las valoraciones).

P. ej. “La concentración se obtiene a partir de una curva de calibrado de seis puntos, mediante la lectura de la concentración correspondiente a la absorbancia de la muestra, corregida por el valor del blanco y multiplicada por el factor de concentración.”

A.9 Reacciones

Este apartado mostrará las reacciones esenciales, siempre que se consideran necesarias para la comprensión del texto o de los cálculos. Éstas justifican los cálculos realizados a partir de los datos obtenidos en las determinaciones y facilitarán el entendimiento del método, especialmente si se producen varios cambios sucesivos en el estado de oxidación del elemento a determinar. Asimismo, en el caso de las valoraciones, son útiles para indicar el número de equivalentes por cada mol de reactivo.

A.10 Reactivos y materiales

Detalle todos los reactivos y materiales requeridos para el proceso analítico, junto a sus características esenciales (concentración, densidad, etc.) y numérelos para posteriores referencias. Indique:

- números de registro CAS (*Chemical Abstract Service*), si está disponible;
- detalles de cualquier peligro asociado, con indicaciones sobre su disposición;

- grado analítico o pureza;
- necesidad de materiales para calibración y control de calidad, que provengan de lotes independientes;
- detalles de preparación, indicado la posibilidad de hacerla por adelantado;
- caducidad del material sin preparar y de los reactivos preparados;
- composición requerida, con detalles de concentración o de otra cantidad;
- requisitos para el etiquetado.

A.11 Aparatos

Describa, con suficiente detalle, el equipamiento individual y cómo está conectado, para evitar su manipulación incorrecta. Numere sus componentes, para referenciarlos posteriormente. Los diagramas y gráficos de flujo pueden resultar clarificadores. En el apartado de “Procedimiento”, dentro de un subapartado titulado “Prueba preliminar” o “Prueba de comprobación” (vea A.13) ha de describirse cualquier comprobación necesaria para el funcionamiento de los aparatos ensamblados.

Detalle los requerimientos mínimos de funcionamiento y verificación, con referencia cruzada a la sección de calibración (A.13) y a cualquier manual del instrumento que sea relevante. Si es necesario, refiérase a los Estándares Internacionales u otros documentos aceptados internacionalmente con respecto al material de vidrio de laboratorio y otros aparatos. Incluya exigencias medioambientales (campanas de extracción, etc.).

A.12 Toma de muestra

La toma de muestra incluye, en este protocolo, tanto el muestreo realizado para obtener la muestra de laboratorio como la etapa de submuestreo realizada en el propio laboratorio con el fin de obtener la submuestra, de la cual se tomará la porción del ensayo.

Si el muestreo para la obtención de la muestra de laboratorio es independiente del análisis químico como tal, es suficiente con hacer referencia, a título informativo, al procedimiento pertinente, tratando específicamente este aspecto. Si no existe ese procedimiento de muestreo apropiado, el apartado de toma de muestra podría incluir un plan y procedimiento de muestreo, mostrando orientación sobre cómo evitar la alteración del producto y teniendo en cuenta los requisitos relativos a la aplicación de métodos estadísticos.

El apartado de toma de muestra debe proporcionar toda la información necesaria para la preparación de la muestra de ensayo a partir de la muestra de laboratorio. Deben incluirse los detalles sobre el almacenamiento, acondicionamiento/pretratamiento y eliminación de residuos. Si esta etapa es especialmente complicada, se justifica la inclusión de un documento adicional, que describa las distintas etapas individualmente.

A.13 Procedimiento

Describa toda la secuencia de operaciones realizadas. Si el método que se describe ya se ha aportado en otra norma, se utilizará la frase “aplique el método especificado en ISO 12345” o “aplique uno de los métodos especificados en ISO 12345”, indicando alguna modificación, si fuese necesario. Mencione aquellas operaciones para las que es necesario tomar precauciones especiales de seguridad. Este apartado incluirá subapartados con los siguientes aspectos.

- porción de ensayo (su preparación a partir de la muestra de ensayo o muestra de laboratorio y la masa o volumen requerido);
- prueba blanco (condiciones y limitaciones);
- pruebas preliminares o de comprobación (p. ej., verificar el funcionamiento correcto de un instrumento de medida);
- determinación (determinaciones) o prueba (pruebas). Se debe incluir el número de medidas o pruebas (p. ej., duplicados) y la descripción detallada de todas las etapas;
- calibrado. Identifique las partes críticas del proceso analítico. Éstas deberán ser controladas mediante un meticuloso procedimiento y calibrado. Haga referencias cruzadas a las secciones anteriores. Incluya la calibración de los equipos – los que necesitan ser calibrados, cómo

hacerlo, con qué y la frecuencia del calibrado. Considere la trazabilidad metrológica apropiada de los calibrantes.

A.14 Cálculos

Describa los cálculos realizados para obtener los resultados. Incluya información sobre las unidades en las que se deben expresar los resultados y otras cantidades; la ecuación utilizada para el cálculo; el significado de los símbolos algebraicos que aparecen en la ecuación; el número de cifras decimales o de cifras significativas con las que se debe expresar el resultado. Los símbolos de las cantidades deben estar de acuerdo con la norma ISO 80000 [14].

A.15 Precisión

Para aquellos métodos que han sido objeto de comparaciones interlaboratorio, se indicarán los datos de precisión (p. ej., la repetibilidad y reproducibilidad). Se calculará la precisión de los datos y se publicará, de acuerdo con la parte relevante de la norma ISO 5725 o de acuerdo con otro Estándar Internacional apropiado, del que se debe aportar la referencia. Exponga con claridad si los valores de precisión se expresan en términos absolutos, relativos o como límites de precisión.

A.16 Aseguramiento de la calidad y control de calidad

Una consecuencia del ejercicio de validación debería ser la descripción de los procedimientos a seguir para el control de calidad interno y externo (Ensayos de Aptitud). Explique qué tipo de control de calidad se aplica, la frecuencia de las comprobaciones del control de calidad durante el análisis de lotes, los criterios de aceptación y rechazo, las acciones a tomar en el proceso en el caso de fallo. Establezca referencias cruzadas a las secciones relevantes presentadas anteriormente.

A.17 Casos especiales

Incluya cualquier modificación al procedimiento requerida por la presencia o ausencia de determinados componentes en el producto analizado. Las modificaciones se deberán referenciar también en el apartado “Alcance”. Cada caso especial deberá incluirse en un título diferente.

A.18 Informe de ensayo

Este apartado debería especificar la información que hay que aportar en el informe de prueba. Se deberán incluir, por lo general, los siguientes aspectos:

- una referencia al método empleado;
- el resultado (los resultados) y un indicador de calidad asociado (precisión; incertidumbre especificada; intervalo de confianza), si es relevante, incluyendo, asimismo, una referencia al apartado “Cálculos”;
- cualquier desviación del procedimiento;
- cualquier característica poco frecuente observada;
- la fecha del ensayo.

A.19 Anexos

Para mejorar su lectura, es conveniente presentar parte de la información en un anexo. Deberá aclararse si el anexo es normativo o informativo. Se pueden anexar datos del trabajo para la validación del método, análisis de riesgos y cálculos de incertidumbre. En este último caso, se deben identificar las fuentes principales de incertidumbre debida al método y presentar la relación de valores asignados. Hay que mencionar aquellas contribuciones insignificantes, que no se han utilizado en los cálculos finales. Se debe detallar la incertidumbre estándar combinada y/o la incertidumbre expandida, así como la explicación sobre cómo se ha obtenido esta última. Se puede incluir el tratamiento más detallado en un archivo referenciado.

A.20 Bibliografía

Si es necesario proporcionar referencias informativas, éstas podrían presentarse en el lugar del texto en el que se han citado o, si son numerosas, en la bibliografía del final del documento.

Anexo B – Bases estadísticas del cálculo del límite de detección *

La Referencia Rápida 2 en la Sección 6.2.3 indicaba que el límite de detección (LOD) se puede calcular multiplicando la desviación estándar adecuada por un factor igual a 3. Este Anexo describe la base estadística de este factor.

El objetivo de la determinación del límite de detección es, habitualmente, establecer la concentración más baja del analito presente en una muestra, que puede ser detectada utilizando un procedimiento de medida dado, con un nivel de confianza específico. La definición del LOD es un proceso de dos pasos. En primer lugar, se establece un “valor crítico”. Este valor es tal que la probabilidad de obtener un resultado en la medida que exceda el valor crítico no es superior a α , si una muestra realmente *no* contiene al analito. El valor crítico establece un criterio para declarar una muestra como positiva. Se utiliza, generalmente, una probabilidad de falso positivo de $\alpha = 0,05$; ello implica un valor crítico próximo a $1,65s$ (donde s es la desviación estándar de un gran número de resultados correspondientes a una muestra blanco o a una muestra que contiene una concentración baja del analito y $1,65$ es el valor del parámetro t de Student de una cola para un número infinito de grados de libertad y un nivel de significación, $\alpha = 0,05$). El valor crítico se expresa de manera más adecuada en términos de concentración aunque puede ser cualquier observación, p. ej., área de pico. Cualquier resultado que exceda el valor crítico debería ser considerado positivo.

Sin embargo, si el valor verdadero de la concentración en una muestra fuera exactamente igual al valor crítico (expresado en términos de concentración), se podría esperar que, aproximadamente, la mitad de los resultados de la medida se encuentre por debajo del valor crítico, proporcionando una tasa de falsos negativos de, aproximadamente, un 50 %. Una tasa de falsos negativos del 50 % es, obviamente, demasiado elevada para ser de uso práctico; el método no da resultados de forma fiable por encima del valor crítico si la concentración es igual al valor crítico. El LOD representa la concentración verdadera para la cual es aceptable la tasa de falso negativo para un valor crítico dado. El error de falso negativo, β , se sitúa, habitualmente, en el valor del error falso positivo, siendo así por razones históricas (IUPAC recomienda valores predeterminados de $\alpha = \beta = 0,05$ [49]). Para $\alpha = \beta = 0,05$, el LOD debe superar $1,65s$ veces el valor crítico especificado. El factor para calcular el LOD con $\alpha = \beta = 0,05$ es, consecuentemente, $1,65+1,65 = 3,30$. Este valor se redondea frecuentemente para dar el cálculo de ‘ $3s$ ’ mostrado en la Referencia Rápida 2. Este enfoque se basa en varias de las aproximaciones descritas en la literatura [49].

El multiplicador 3, calculado según se describe en el párrafo anterior, surge del valor de la t de Student de una cola para infinitos grados de libertad, redondeado por defecto a una cifra significativa. Para una estimación estadística rigurosa del LOD, el factor multiplicativo utilizado debería tener en cuenta el número de grados de libertad asociado a la estimación de s . Por ejemplo, si se obtiene s a partir de 10 réplicas, el valor de t de Student para $\alpha = 0,05$ es 1,83 (9 grados de libertad). Esto conduce a un valor de LOD calculado como $3,7s$.

* El texto está basado en la Guía Eurachem sobre Terminología en la Medida Analítica [8].

Anexo C – Análisis de la varianza (ANOVA)

La idea central del ‘análisis de varianza’ (ANOVA) es que cuando en una serie de datos replicados estos se pueden agrupar de una misma manera, p. ej., por analista, instrumento, día, laboratorio, método, etc., la variación total en la serie completa se puede representar como la combinación de las varianzas (s^2) entre grupos y dentro de los grupos. Se puede usar ANOVA para evaluar los resultados a partir del tipo de estudio experimental mostrado en la Figura C 1. En este diseño anidado, se repiten las medidas replicadas (obtenidas generalmente en condiciones de repetibilidad) en series diferentes de medida para obtener p grupos de datos. Para estimar la precisión intermedia de dicho estudio debería existir la máxima variación en las condiciones en las que realizan las series (diferentes días, analistas, etc.).

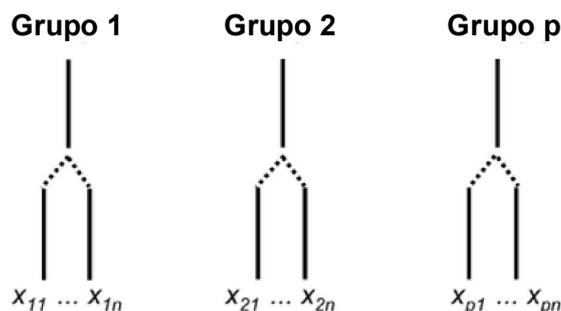


Figura C 1 – Ejemplo de un ‘diseño anidado’ correspondiente a un experimento en el que se pueden evaluar distintas medidas de precisión utilizando ANOVA

En la Figura C 2 se muestra la forma general de una tabla ANOVA de un factor, para un total de N resultados, distribuidos en p grupos de n observaciones y con ν grados de libertad. Cada línea de la tabla hace referencia a una fuente de variación distinta. La primera fila responde a la variación entre las medias de los grupos; la segunda describe la variación dentro de los grupos y la tercera describe la variación del conjunto de los datos en su totalidad. Las hojas de cálculo y el software estadístico también proporcionan los valores de F y de F crítico, así como el valor correspondiente de P (probabilidad).

Fuente de variación	Suma de cuadrados (SS)	ν	Cuadrado medio (MS)	F	P	F_{crit}
Entre grupos	SS_e	$p-1$	$MS_e = SS_e/(p-1)$	MS_e/MS_i		
Intra grupo (residuales)	SS_i	$N-p$	$MS_d = SS_d/(N-p)$			
Total	$SS_{tot} = SS_e + SS_i$	$N-1$				

Figura C 2 – Estructura de una tabla ANOVA de un factor

A los valores relacionados con la variación entre grupos se les designa, casi siempre, con los términos ‘entre grupos’ o se identifican por el factor de agrupamiento (p. ej., analista, día o laboratorio). Se usan diferentes términos en software, libros de texto, etc., para describir la variación dentro del grupo, siendo los más comunes ‘intra- grupo’, ‘residual’, ‘error’ o ‘medida’.

Asumiendo que el diseño anidado que se muestra en la Figura C 1 se realiza en un único laboratorio, que las réplicas dentro de cada grupo se han obtenido en condiciones de repetibilidad y que las

condiciones analíticas variaron entre grupos, la repetibilidad y la precisión intermedia se puede calcular según se indica a continuación.

1. La desviación estándar de la repetibilidad s_r , se obtiene calculando la raíz cuadrada del término del cuadrado medio dentro del grupo, que representa la varianza intra-grupo:

$$s_r = \sqrt{MS_i} \quad (\text{Ec. C1})$$

2. La contribución a la variación total del factor de agrupamiento (s_i) también se obtiene a partir de la tabla ANOVA:

$$s_i = \sqrt{\frac{MS_e - MS_i}{n}} \quad (\text{Ec. C2})$$

3. La precisión intermedia s_I puede, en consecuencia, calcularse combinando los componentes de la varianza intra-grupo y entre grupos, descritos anteriormente:

$$s_I = \sqrt{s_r^2 + s_i^2} \quad (\text{Ec. C3})$$

El experimento mencionado en la Sección 6.6.4 se puede ilustrar como sigue. Como parte de un ejercicio de validación de un método en un único laboratorio, se realizaron duplicados durante cada uno de los ocho días (Tabla C1). Cada día, las medidas se realizaron en condiciones de repetibilidad pero con diferentes analistas, diferentes equipos, etc. en los distintos días, de manera que se imitan las condiciones en las cuales se usará el método de manera rutinaria.

Tabla C1 – Ejemplo de una configuración experimental que permite evaluar la repetibilidad y precisión intermedia mediante el ANOVA de un factor con un número aceptable de grados de libertad

Día:	1		2		3		4		5		6		7		8	
Resultado:	$x_{1,1}$	$x_{1,2}$	$x_{2,1}$	$x_{2,2}$	$x_{3,1}$	$x_{3,2}$	$x_{4,1}$	$x_{4,2}$	$x_{5,1}$	$x_{5,2}$	$x_{6,1}$	$x_{6,2}$	$x_{7,1}$	$x_{7,2}$	$x_{8,1}$	$x_{8,2}$

Se puede usar el ANOVA de un factor para separar la variación inherente al método (repetibilidad) de la debida a diferencias en las condiciones de medida, p. ej., diferentes analistas, equipo, período amplio de tiempo (precisión intermedia). Observar que con este enfoque, no es posible alcanzar conclusiones sobre qué parámetros –analista, equipo, tiempo- contribuyen en mayor medida a la precisión intermedia, si bien esto no se necesita generalmente en la etapa de validación.

La aplicación de un ANOVA de una vía a los resultados de la Tabla C1 conducirá a una tabla de resultados similar a la de la Figura C 2. Los valores F , F crítico y P permitirán extraer conclusiones sobre si la variación entre resultados obtenidos en días diferentes es significativamente superior a la variación de los resultados obtenidos en un mismo día. Los valores para las dos medidas de precisión (s_r and s_I) se calculan, entonces, de forma inmediata, a partir de las ecuaciones Ec. C1 – Ec. C3, mostradas anteriormente. El número de grados de libertad asociado (ν) será $N-p = 16-8 = 8$ para s_r . El valor de ν para la precisión intermedia es más complejo pero no será inferior a $p-1$, p. ej. 7 en este ejemplo (véase la Figura C 2). Esto lleva a un compromiso razonable entre la carga de trabajo y la incertidumbre en el cálculo de la precisión.

Anexo D – Notas sobre los análisis cualitativos

Los análisis cualitativos siguen los principios básicos del análisis cuantitativo pero es necesario aplicar conceptos singulares, tanto al describir las propiedades del método como para la interpretación de los resultados. Este apéndice introduce brevemente el análisis cualitativo y apunta hacia la orientación pertinente.

La IUPAC define el análisis Cualitativo como: *análisis en el que se identifican o clasifican las sustancias en base a sus propiedades físicas o químicas, tales como la reactividad química, solubilidad, masa molecular, punto de fusión, propiedades radiactivas (emisión, absorción), espectro de masas, vida media nuclear, etc.* [17]. Esto significa que los resultados se expresan en una escala nominal, que es inferior a la expresión de los resultados en una escala de proporción. Se recomienda usar el análisis cualitativo en lugar del cuantitativo principalmente con el propósito de detección utilizando métodos de bajo coste o para concentraciones del analito próximas al límite de detección (LOD).

Un ‘método cualitativo’ proporciona, efectivamente, una respuesta ‘Sí’/‘No’ para una concentración de corte dada de un analito [55]. La validación supone la identificación de la concentración de corte para **clasificar/diagnosticar una condición**, p. ej., la presencia o ausencia de un agente contaminante en agua, para la que existe una directiva, ley, etc., que define qué concentración de corte se debe aplicar.

Para caracterizar las propiedades de un método cualitativo, es óptimo utilizar un método cuantitativo con propiedades metrológicas superiores (método confirmatorio), p. ej., menor LOD, de manera que se pueda determinar el estado verdadero con o sin una condición dada. Se debería determinar las propiedades de un método cualitativo para un número de concentraciones inferiores, coincidentes y superiores a la concentración de corte. Es preferible el empleo de un método cuantitativo confirmatorio al uso de muestras blanco adicionadas y no adicionadas.

En los métodos cualitativos, la precisión no se puede expresar como una desviación estándar o desviación estándar relativa, pero puede ser expresada como tasa de verdaderos positivos y falsos positivos, y de verdaderos negativos y falsos negativos [55, 85, 86, 87]. Esto se ilustra en la Figura D1.

	Muestras por encima de la concentración de corte	Muestras por debajo de la concentración de corte	
Prueba positiva	Pruebas positivas verdaderas	Pruebas positivas falsas (error del tipo I)	Número total de pruebas positivas
Prueba negativa	Pruebas negativas falsas (error del tipo II)	Pruebas negativas verdaderas	Número total de pruebas negativas
	Número total de muestras por encima de la concentración de corte	Número total de muestras por debajo de la concentración de corte	

Figura D1 – Tabla A 2 × 2 que proporciona las bases para el cálculo de las tasas de falso positivo y de falso negativo

La ‘sensibilidad diagnóstica’ es la proporción de muestras con una determinada condición, p. ej., concentración superior a la concentración de corte, que proporciona resultados positivos al análisis. La sensibilidad diagnóstica es una característica fundamental del método cualitativo, que expresa su capacidad para detectar pequeñas cantidades del analito en una muestra, de manera que se obtenga la respuesta binaria Sí/No para un nivel de probabilidad predefinido.

$$\text{Sensibilidad diagnóstica} = \frac{\text{número de muestras verdaderos positivos}}{\text{número total de muestras con condición}} \quad (\text{Ec. D1})$$

La ‘especificidad diagnóstica’ es la proporción de muestras sin condición alguna, p. ej., concentración inferior a la concentración de corte, que dan resultados negativos al análisis cualitativo.

$$\text{Especificidad diagnóstica} = \frac{\text{número de muestras verdaderos negativos}}{\text{número total de muestras sin condición}} \quad (\text{Ec. D2})$$

Si es posible, se debe utilizar datos comparativos de un método confirmatorio. En caso contrario, se pueden medir muestras blanco adicionadas y no adicionadas.

Los parámetros importantes para medir la calidad en análisis cualitativo son el LOD y el límite de corte (Figura D2). El LOD se define de manera análoga a como se hace en análisis cuantitativo; la concentración de un analito que proporciona una señal que se puede distinguir estadísticamente del valor medio de la señal de muestras blanco pertinentes. El límite de corte, si se determina correctamente, se encuentra donde la tasa de falsos negativos, para concentraciones superiores al límite, es baja. En la validación, se evalúa el límite de corte propuesto en el procedimiento documentado.

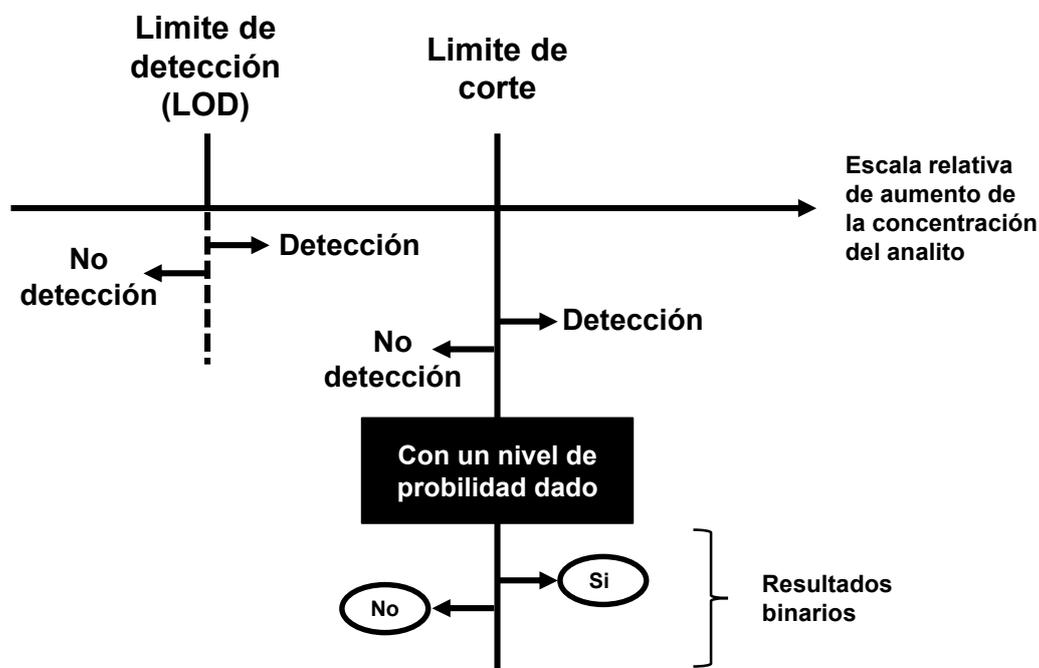


Figura D2 – Hay dos referencias cuantitativas que originan una respuesta binaria en el tipo de cuantificación/clasificación en análisis cualitativo: 1. El límite de detección (LOD), que es inherente al método, 2. El límite de corte, dado en el procedimiento documentado. Ambos se sitúan en una escala imaginaria de concentración creciente. En la zona de detección, por encima del límite de detección, el límite de corte nos permite distinguir regiones de concentración del componente en las cuales se obtiene la respuesta binaria correcta: p. ej., No por debajo de los límites y Sí por encima de ellos.

Se utilizan varios conceptos adicionales en análisis cualitativo (Tabla D1). Los **valores predictivos** de los resultados se pueden incrementar aumentando el predominio de la concentración por encima de la de corte en las muestras analizadas por el método cualitativo, p. ej., fuentes de información distintas a las del método químico cualitativo. Esto mejorará sustancialmente el valor práctico del método de medida cualitativo.

La **selectividad** de un método de medida cualitativo es un concepto ordinal: la extensión en la que analitos distintos al incluido en la especificación interfieren en el análisis. Esta característica

fundamental del método se puede definir también como su capacidad para producir resultados que no están influidos por efectos de matriz.

Tabla D1 – Definición y cálculo de los conceptos que describen las propiedades diagnósticas de los métodos de medida, incluyendo los métodos de medida cualitativos

Concepto (símbolo)	Descripción	Fórmula
Relación de probabilidad positiva ($RP+$)	La relación de la tasa de verdadero positivo con respecto a la tasa de falso positivo.	$RP+ = \frac{\text{sensibilidad diagnóstica}}{1 - \text{especificidad diagnóstica}}$
Relación de probabilidad negativa ($RP-$)	La relación de la tasa de falso negativo con respecto a la tasa de verdadero negativo.	$RP- = \frac{1 - \text{sensibilidad diagnóstica}}{\text{especificidad diagnóstica}}$
Relación de probabilidad diagnóstica (RPD)	Combina los conceptos de sensibilidad diagnóstica, especificidad diagnóstica y las relaciones de probabilidad en un único número.	$RPD = \frac{RP+}{RP-}$
Valor predictivo positivo (VPP)	La proporción de muestras con un resultado positivo en el análisis cualitativo que tienen la condición. Se tiene en cuenta la prevalencia de la condición en la población objetivo de las muestras.	$VPP = \frac{\text{Número de verdaderos positivos}}{\text{Número total de positivos}}$
Valor predictivo negativo (VPN)	La proporción de muestras con un resultado negativo en el análisis cualitativo que no tienen la condición. Se tiene en cuenta la prevalencia de la condición en la población objetivo de las muestras.	$VPN = \frac{\text{Número de verdaderos negativos}}{\text{Número total de negativos}}$

Bibliografía

(Para actualizar las referencias más importantes consultar el documento Reading List localizado en el apartado de Publicaciones de la web de Eurachem, www.eurachem.org.)

1. ISO/IEC 17025:2005 General requirements for the competence of testing and calibration laboratories, ISO Geneva.
2. ISO 15189:2012 Medical laboratories – Requirements for quality and competence, ISO Geneva.
3. ISO 15195:2003 Laboratory medicine – Requirements for reference measurement laboratories, ISO Geneva.
4. J. N. Miller, Basic statistical methods for analytical chemistry. Part 2. Calibration and regression methods. A review, *Analyst*, 1991, 116, 3.
5. J. C. Miller, J. N. Miller, *Statistics and chemometrics for analytical chemistry*, 6th ed., Pearson, Harlow, 2010, ISBN 978-0-273730422.
6. S. L. R. Ellison, V. J. Barwick, T. J. Duguid Farrant, *Practical statistics for the analytical scientist. A bench guide*, 2nd ed., RSC Publishing, Cambridge, 2009, ISBN 978-0-85404-131-2.
7. International vocabulary of metrology – Basic and general concepts and associated terms (VIM), JCGM 200:2012, www.bipm.org. A previous version is published as ISO/IEC Guide 99:2007, ISO Geneva.
8. V. J. Barwick, E. Prichard (eds.), *Eurachem Guide: Terminology in analytical measurement – Introduction to VIM 3*, Eurachem, 2011, ISBN 978-0-948926-29-7, www.eurachem.org.
9. ISO 9000:2005 Quality management systems – Fundamentals and vocabulary, ISO Geneva.
10. ISO 9001:2008 Quality management systems – Requirements, ISO Geneva.
11. ISO online browsing platform (OBP), <https://www.iso.org/obp/ui/>.
12. M. Thompson, S. L. R. Ellison, R. Wood, Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC technical report), *Pure Appl. Chem.*, 2002, **74**(5), 835.
13. Validation of analytical procedures: Text and methodology Q2(R1), ICH harmonised tripartite guideline, 2005, www.ich.org.
14. ISO 80000-1:2009 Quantities and units – Part 1: General, ISO Geneva.
15. M. H. Ramsey and S. L. R. Ellison (eds.), *Eurachem/EUROLAB/CITAC/Nordtest/AMC Guide: Measurement uncertainty arising from sampling: a guide to methods and approaches*, Eurachem, 2007, ISBN 978-0-948926-26-6, www.eurachem.org.
16. AMC technical brief No. 19, March 2005, M. Thompson (ed.), *Terminology – the key to understanding analytical science. Part 2: Sampling and sample preparation*, www.rsc.org.
17. *Compendium of chemical terminology (IUPAC Gold Book)*, www.iupac.org.
18. *Compendium of analytical nomenclature (IUPAC orange book)*, www.iupac.org.
19. Method validation of U.S. Environmental Protection Agency microbiological methods of analysis. Prepared for The EPA forum on environmental measurements (FEM). The FEM Microbiology Action Team, FEM Document Number 2009-01, 7 Oct., 2009.
20. ISO 10012:2003 Measurement management systems - Requirements for measurement processes and measuring equipment, ISO Geneva.
21. Evaluation of measurement data – Guide to the expression of uncertainty in measurement (GUM), JCGM 100:2008 (corrected version 2010), www.bipm.org. Printed as ISO/IEC Guide 98-3:2008, ISO Geneva.
22. S. L. R. Ellison, A. Williams (eds.), *Eurachem/CITAC Guide CG4: Eurachem/CITAC, Quantifying uncertainty in analytical measurement*, 3rd ed., Eurachem, 2012, www.eurachem.org.
23. Guide to method validation for quantitative analysis in chemical testing laboratories, INAB Guide PS15, 3 April 2012, www.inab.ie.

24. CLSI, User verification of performance for precision and trueness; Approved guideline – 2nd ed. CLSI document EP15-A2. Wayne PA, Clinical and Laboratory Standards Institute 2005, www.clsi.org.
25. AOAC Guidelines for collaborative study procedures to validate characteristics of a method of analysis, 2002, www.aoac.org.
26. Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies, (IUPAC technical report), Pure Appl. Chem., 1995, **67**(2), 331.
27. ASTM E1601-12 Standard practice for conducting an interlaboratory study to evaluate the performance of an analytical method, 2012, www.astm.org.
28. CEN/TR 10345:2013 Guideline for statistical data treatment of inter laboratory tests for validation of analytical methods, CEN Brussels.
29. ISO 5725 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results – Parts 1-6, ISO Geneva.
30. ISO Guide 30:1992/Amd 1:2008 Terms and definitions used in conjunction with reference materials, ISO Geneva.
31. M. Thompson, P. J. Lowthian, Notes on statistics and data quality for analytical chemists, Imperial College Press, 2011, ISBN 978-1848166172.
32. E. Mullins, Statistics for the quality control chemistry laboratory, RSC, Cambridge, 2003, ISBN 978-0-854074-671-3.
33. W. Funk, V. Dammann, G. Donnevert, Quality assurance in analytical chemistry: Applications in environmental, food, and materials analysis, biotechnology, and medical engineering, 2nd ed., Wiley-VCH, Weinheim, 2006, ISBN 978-3-527-31114-9.
34. A. Kallner, Laboratory statistics. Handbook of formulas and terms (1st ed.), Elsevier, 2013, ISBN 978-0-12-416971-5.
35. Codex Alimentarius Commission, Procedural manual 21st ed., 2013.
36. Council Directive 98/83/EC (3 November 1998) on the quality of water intended for human consumption.
37. Commission Directive 2009/90/EC (31 July 2009) laying down, pursuant to Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council, technical specifications for chemical analysis and monitoring of water status.
38. Commission Decision 2002/657/EC (12 August 2002) implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results.
39. SANCO/12571/2013 (19 Nov. 2013) Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed.
40. AMC technical brief No. 17, July 2004, M. Thompson (ed.), The amazing Horwitz function, www.rsc.org.
41. Selectivity in analytical chemistry (IUPAC recommendations 2001), Pure Appl. Chem., 2001, **73**(8), 1381.
42. NATA – Technical report #17 – Guidelines for the validation and verification of quantitative and qualitative methods, 2012.
43. E. Theodorsson, Validation and verification of measurement methods in clinical chemistry, Bioanalysis, 2012, **4**(3), 305.
44. AMC technical brief No. 37, March 2009, M. Thompson (ed.), Standard additions: myth and reality, www.rsc.org.
45. ISO 11843-1:1997/Cor 1:2003 Capability of detection – Part 1: Terms and definitions, ISO Geneva.
46. ISO 11843-2:2007 Capability of detection – Part 2: Methodology in the linear calibration case, ISO Geneva.

47. ISO 11843-3:2002 Capability of detection – Part 3: Methodology for determination of the critical value for the response variable when no calibration data are used, ISO Geneva.
48. ISO 3534 Statistics – Vocabulary and symbols – Parts 1-3, ISO Geneva.
49. Nomenclature in evaluation of analytical methods, including detection and quantification capabilities (IUPAC Recommendations 1995), *Pure Appl. Chem.*, 1995, **67**, 1699.
50. L. A. Currie, *Detection in analytical chemistry – Importance, theory, and practice*, ACS Symposium Series 361, American Chemical Society, Washington, DC 1988.
51. Analytical Methods Committee, Recommendations for the definition, estimation and use of the detection limit, *Analyst*, 1987, **112**, 199.
52. A. Shrivastava, V. B. Gupta, Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods, *Chronicles of Young Scientists*, 2011, **2**(1), 21.
53. United States Pharmacopeia, *Validation of compendial methods*, 26th revision, National Formulary, 21st ed. Rockville, MD: The United States Pharmacopeial Convention Inc., 2003.
54. Commission Regulation (EC) No 333/2007 (28 March 2007) laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of lead, cadmium, mercury, inorganic tin, 3-MCPD and benzo(a)pyrene in foodstuffs, *Off. J. EU*, L 88/29, 29 March 2007.
55. M. Valcárcel, S. Cárdenas, D. Barceló et al., *Metrology of qualitative chemical analysis*, report EUR 20605 EN, European Commission, 2002, ISBN 92-894-5194-7.
56. H. Sahai, R. P. Singh, The use of R² as a measure of goodness of fit: An overview, *Virginia Journal of Science*, 1989, **40**(1), 5.
57. Analytical Methods Committee, Uses (proper and improper) of correlation coefficients, *Analyst*, 1988, **113**, 1469.
58. ISO 11732:2005 Water quality – Determination of ammonium nitrogen – Method by flow analysis (CFA and FIA) and spectrometric detection, ISO Geneva.
59. A. Menditto, M. Patriarca, B. Magnusson, Understanding the meaning of accuracy, trueness and precision, *Accred. Qual. Assur.*, 2007, **12**, 45.
60. D. T. Burns, K. Danzer, A. Townshend, Use of the terms “recovery” and “apparent recovery” in analytical procedures (IUPAC Recommendations 2002), *Pure Appl. Chem.*, 2002, **74**(11), 2201.
61. S. L. R. Ellison, B. King, M. Rösslein, M. Salit, A. Williams (eds.), *Eurachem/CITAC Guide Traceability in chemical measurement. A guide to achieving comparable results in chemical measurement*, 1st ed, Eurachem, 2003, www.eurachem.org.
62. P. De Bièvre, R. Dybkaer, A. Fajgelj, D. Brynn Hibbert, *Metrological traceability of measurement results in chemistry: Concepts and implementation (IUPAC Technical Report)*, *Pure Appl. Chem.*, 2011, **83**(10), 1873.
63. AMC technical brief No. 21, Sept. 2008, M. Thompson (ed.), *The estimation and use of recovery factors*, www.rsc.org.
64. ISO Guide 33:2000 Uses of certified reference materials, ISO Geneva.
65. T. Linsinger, Application note 1, Rev. 3 2010. Comparison of a measurement result with the certified value, www.erm-crm.org.
66. B. Magnusson, T. Näykki, H. Hovind, M. Krysell, *Handbook for calculation of measurement uncertainty in environmental laboratories*, Nordtest Report TR 537 (ed. 3.1) 2012, www.nordtest.info.
67. ISO 21748:2010 Guidance for the use of repeatability, reproducibility and trueness estimates in measurement uncertainty estimation, ISO Geneva.
68. Eurolab, *Measurement uncertainty revisited: Alternative approaches to uncertainty evaluation*, Technical report No. 1/2007, www.eurolab.org.
69. S. L. R. Ellison, A. Williams, *Measurement uncertainty: the key to the use of recovery factors? From “The use of recovery factors in trace analysis”*, M. Parkany (ed.), RSC, Cambridge, 1996, ISBN 0-85404-736-0.

70. V. J. Barwick, S. L. R. Ellison, Measurement uncertainty: approaches to the evaluation of uncertainties associated with recovery, *Analyst*, 1999, **124**, 981.
71. S. L. R. Ellison, V. J. Barwick, Estimating measurement uncertainty: Reconciliation using a cause and effect approach, *Accred. Qual. Assur.*, 1998, **3**, 101-105.
72. G. E. O'Donnell, D. B. Hibbert, Treatment of bias in estimating measurement uncertainty, *Analyst*, 2005, **130**, 721.
73. B. Magnusson, S. L. R. Ellison, Treatment of uncorrected measurement bias in uncertainty estimation for chemical measurements, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2008, **390**, 201.
74. W. J. Youden, E. H. Steiner, *Statistical Manual of the AOAC*, AOAC International, 1975, ISBN 0-935584-15-3.
75. Harmonised guidelines for internal quality control in analytical chemistry laboratories, (IUPAC technical report), *Pure Appl. Chem.*, 1995, **67**(4), 649.
76. H. Hovind, B. Magnusson, M. Krysell, U. Lund, and I. Mäkinen, Internal quality control – Handbook for chemical laboratories, Nordtest technical report 569, 4th ed., 2011, www.nordtest.info.
77. ISO 7870 Control charts – Parts 1-5, ISO Geneva.
78. AMC technical brief No. 9, Feb. 2002, M. Thompson (ed.), A simple fitness-for-purpose control chart based on duplicate results obtained from routine test materials, www.rsc.org.
79. ISO/IEC 17011:2004 Conformity assessment – General requirements for accreditation bodies accrediting conformity assessment bodies, ISO Geneva.
80. ISO/IEC 17043:2010 Conformity assessment – General requirements for proficiency testing, ISO Geneva.
81. I. Mann, B. Brookman (eds.), *Eurachem Guide: Selection, use and interpretation of proficiency testing (PT) schemes by laboratories*, 2nd ed., Eurachem, 2011, www.eurachem.org.
82. EA-4/18 TA, Guidance on the level and frequency of proficiency testing participation, European co-operation for Accreditation, 2010, www.european-accreditation.org.
83. ISO 78-2:1999 Chemistry – Layouts for standards - Part 2: Methods of chemical analysis, ISO Geneva.
84. S.L.R. Ellison, A. Williams (eds.), *Eurachem/CITAC Guide: Use of uncertainty information in compliance assessment*, Eurachem, 2007, www.eurachem.org.
85. R. R. Galen, S. R. Gambino, *Beyond normality: The predictive value and efficiency of medical diagnoses*, John Wiley and Sons, 1975, ISBN 978-0471290476.
86. M. S. Pepe, *The statistical evaluation of medical tests for classification and prediction*, Oxford University Press, Oxford, 2003, ISBN 978-0-19-850984-4.
87. X-H. Zhou, N.A. Obuchowski, D.K. Mcclish, *Statistical methods in diagnostic medicine*, 2nd ed., Wiley-Interscience, New York, 2011, ISBN 978-0-470-18314-4.

