



**VALIDACIÓN, VERIFICACIÓN DE MÉTODOS Y
CÁLCULO DE INCERTIDUMBRE**

Código: PRO-DLQ-106
Emisor: DGT-DL-DLQ
Versión: 01
Vigente: 08/05/2023
Página: 1 de 23

VALIDACION, VERIFICACIÓN DE METODOS Y CÁLCULO DE INCERTIDUMBRE

MODIFICADO POR	VERIFICADO POR	APROBADO POR
Nombre y Apellido: Jessica Espinola Jessica Samaniego Karen Benítez Lorena Lezcano Carmen Rodas Alba Dominguez	Nombre y Apellido: Jadiyi Torales	Nombre y Apellido: Cesar Rivas
Cargo: Técnicas	Cargo: Directora de Laboratorios	Cargo: Director General Técnico
Firma:	Firma:	Firma:
Fecha: 27/04/2023	Fecha: 04/05/2023	Fecha: 08/05/2023



VALIDACIÓN, VERIFICACIÓN DE MÉTODOS Y CÁLCULO DE INCERTIDUMBRE

Código: PRO-DLQ-106
Emisor: DGT-DL-DLQ
Versión: 01
Vigente: 08/05/2023
Página: 2 de 23

1. OBJETIVO

Describir los parámetros para evaluar las características de los métodos de ensayo y confirmación utilizados y su adecuación al uso previsto a fin de:

- Proporcionar un alto grado de confianza y seguridad en el método analítico y en la calidad de los resultados.
- Conocer las características de funcionamiento de los métodos.

2. ALCANCE

Este documento se aplica como una guía para la validación, verificación y cálculo de incertidumbre de los métodos de ensayo utilizados en todos los laboratorios del Departamento de Laboratorios Químicos.

3. SIGLAS Y DEFINICIONES:

3.1 Siglas:

- a) **DRS%:** Desviación relativa estándar.
- b) **S:** Desviación estándar.
- c) **LD:** Límite de detección.
- d) **LC:** Límite de cuantificación
- e) **DL:** Dirección de Laboratorios.
- f) **DLQ:** Departamento de Laboratorios Químicos.
- g) **EN:** Normas Europeas
- h) **NM:** Normas Mercosur
- i) **ASTM:** American Society of Testing Materials
- j) **CIPAC:** Collaborative International Pesticides Analytical Council Limited.
- k) **EPA:** United States Environmental Protection Agency
- l) **AOAC:** Association of Official Agricultural Chemists.
- m) **USP:** United States Pharmacopeia

3.2 Definiciones:

- a) **Validación de un método de ensayo:** Proceso de evaluación de las características de funcionamiento de un procedimiento de medida y de comprobación del cumplimiento de ciertos criterios prefijados.
- b) **Métodos normalizados:** Se consideran métodos normalizados aquellos emitidos por organismos de normalización internacionales (ej. ISO), regionales (normas europeas EN o Mercosur NM), o ASTM, CIPAC, etc. También se consideran métodos "normalizados" los emitidos por organizaciones internacionales reconocidas como EPA, AOAC, USP, etc.
- c) **Modificación de un método Normalizado:** Son métodos normalizados con modificaciones.
- d) **Métodos internos:** Son métodos desarrollados por el Laboratorio.

4. RESPONSABILIDAD:

La responsabilidad de la implementación del presente procedimiento es de los técnicos designados para realizar la validación, verificación y cálculo de incertidumbre de cada Laboratorio.

5. ACTIVIDADES

5.1 Plan de validación y/o verificación



VALIDACIÓN, VERIFICACIÓN DE MÉTODOS Y CÁLCULO DE INCERTIDUMBRE

Código: PRO-DLQ-106
Emisor: DGT-DL-DLQ
Versión: 01
Vigente: 08/05/2023
Página: 3 de 23

El primer paso para la evaluación de un método analítico es definir claramente el objeto, alcance y medios para la validación o verificación.

Para ello, se establecerá por cada método a validar un Plan de Validación indicando:

- método a validar
- parámetros de validación en función del tipo de método.
- Desarrollo de la validación:

Cada laboratorio dependiendo de su método analítico describirá detalladamente cómo realizará la validación, debiendo constar esto en el FOR-DLQ- 153 “Plan de Validación de Métodos”.

5.2 Validación

La validación del método se llevará a cabo principalmente en los siguientes casos: métodos de referencia modificados y métodos desarrollados internamente por el Laboratorio.

La verificación del método se llevará a cabo en casos de utilizar métodos oficiales normalizados, los cuales sólo sería necesario comprobar (verificar) que se cumplen los parámetros de calidad establecidos en dichos métodos.

En la Tabla siguiente se indican los parámetros que es preciso conocer en función del tipo de método:

Método Normalizado	Modificación de un método Normalizado	Método Interno
Comprobar que el Laboratorio domina el ensayo y lo utiliza correctamente. <u>Parámetros a verificar:</u> <ul style="list-style-type: none"> • Exactitud. • Repetibilidad. • Incertidumbre. 	Comprobar que el Laboratorio con los cambios introducidos domina el ensayo y lo utiliza correctamente. <u>Parámetros a validar:</u> <ul style="list-style-type: none"> • Exactitud. • Repetibilidad. • Reproducibilidad • Intervalo de trabajo • Linealidad • Recuperación • Selectividad/Especificidad • Incertidumbre • Límites de detección y cuantificación • Sensibilidad • Sesgo • Robustez 	Comprobar que el Laboratorio domina el ensayo desarrollado y lo utiliza correctamente. <u>Parámetros a validar:</u> <ul style="list-style-type: none"> • Exactitud • Repetibilidad. • Reproducibilidad • Intervalo de trabajo • Linealidad • Recuperación • Selectividad/Especificidad • Incertidumbre • Límites de detección y cuantificación • Sensibilidad • Sesgo • Robustez

5.3 Parámetros de validación

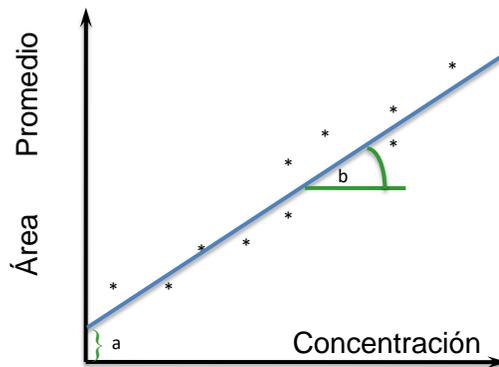
El proceso de validación comprende la evaluación de las características analíticas que se indican a continuación:

5.3.1 Linealidad

Se efectúan los siguientes pasos:

- 1) Realizar una lectura del blanco de reactivos (diluyente) para la línea de base.

- 2) Preparar al menos cinco soluciones de trabajo cuyas concentraciones se encuentren dentro del rango de trabajo, para realizar la recta de regresión.



Obs: Realizar las soluciones de trabajo a partir Material de Referencia Certificado o Estándares primarios en cada punto, caso contrario se podrá trabajar con muestras enriquecidas no superando el 20% de la concentración original para no alterar la matriz. Para el caso de fertilizantes como normalmente se utilizan curva de calibrado con estándar primario, se debe realizar curvas comparativas con sales de elevada pureza.

- 3) Analizar cada muestra según el procedimiento correspondiente.
- 4) Determinar la relación entre la respuesta instrumental y la concentración. Si es una relación lineal será una recta del tipo **Y = bx + a**.

Y = la respuesta
 b = la pendiente
 x = la concentración
 a = el término independiente (ordenada en el origen)

Para evaluar esta relación, se lleva a cabo el test de correlación y se calcula el coeficiente de correlación "r" de la recta.

5.3.1.1 Evaluación de Resultados

La evaluación de los resultados consiste en: Verificar que los resultados pertenecen a la misma población estadística

Calcular los promedios en cada celda con un decimal más que los datos originales:

$$\bar{y}_{ij} = \frac{1}{n_{ij}} \sum_{k=1}^{n_{ij}} y_{ijk} \quad \text{Ec(1)}$$

Calcular la desviación estándar en cada celda:

$$S_{ij} = \sqrt{\frac{1}{n_{ij} - 1} \sum_{k=1}^{n_{ij}} (y_{ijk} - \bar{y}_{ij})^2} \quad \text{Ec(2)}$$

Evaluar los resultados y eliminar los valores anómalos.

Test de Cochran's

Consiste en calcular el estadístico C

$$C = \frac{S_{ij}^2 \max}{\sum_{i=1}^p S_{ij}^2} \quad \text{Ec(3)}$$

y compararlo con el valor tabulado (Anexos) en caso de incumplimiento se puede pensar en eliminar esos datos.

Test de Grubbs

Primera evaluación

Consiste en calcular el estadístico G_{ij}

$$G_{ij} = \frac{\bar{y}_{ij} - \bar{y}_j}{\sqrt{\frac{1}{(p_j - 1)} \sum_{i=1}^{p_j} (\bar{y}_{ij} - \bar{y}_j)^2}} \quad \text{Ec(4)}$$

Y se debe comparar con el valor tabulado (Anexos) tanto para 95% y 99% de confianza. En caso de superar el 99% se considera el valor como outlier pero si está entre 95% y 99% se considera sospechoso.

Si la primera evaluación no reporta ningún valor outlier o sospechoso se debe realizar la segunda prueba.

Segunda Prueba

Consiste en calcular el estadístico G_{\max} y G_{\min}

$$G = \frac{S_{p-1,p}^2}{S_0^2}$$

$$S_0^2 = \sum_{i=1}^p (\bar{y}_{ij} - \bar{y}_j)^2 \quad \text{Ec(5)}$$

$$S_{p-1,p}^2 = \sum_{i=1}^{p-2} (\bar{y}_{ij} - \bar{y}_{i-2})^2$$

Se debe calcular 2 en realidad. En el primer caso G_{\max} se elimina los 2 valores más altos y para el segundo G_{\min} se elimina los 2 valores más bajos.

Relación entre la concentración y la respuesta obtenida por el método

Con los datos ya evaluados se debe realizar una correlación lineal entre la concentración y la respuesta obtenida por el método (área promedio).

1. Establecer un modelo lineal

$$\bar{y}_j = a + b\hat{y}_j \quad \text{Ec(6)}$$

2. Calcular la pendiente y el intercepto

$$b = \frac{\sum_{j=1}^q \hat{y}_j * \bar{y}_j - \frac{\sum_{j=1}^q \hat{y}_j * \sum_{j=1}^q \bar{y}_j}{q}}{\sum_{j=1}^q \hat{y}_j^2 * \frac{\left(\sum_{j=1}^q \hat{y}_j\right)^2}{q}} \quad \text{Ec(7)}$$

$$a = \frac{\sum_{j=1}^q \bar{y}_j - b * \sum_{j=1}^q \hat{y}_j}{q} \quad \text{Ec(8)}$$

3. Calcular el coeficiente de correlación

$$r = \frac{\sum_{j=1}^q \hat{y}_j * \bar{y}_j - \frac{\sum_{j=1}^q \hat{y}_j * \sum_{j=1}^q \bar{y}_j}{q}}{\sqrt{\left(\sum_{j=1}^q \hat{y}_j^2 - \frac{\left(\sum_{j=1}^q \hat{y}_j\right)^2}{q}\right) \left(\sum_{j=1}^q \bar{y}_j^2 - \frac{\left(\sum_{j=1}^q \bar{y}_j\right)^2}{q}\right)}} \quad \text{Ec(9)}$$

4. Calcular la covarianza

$$\text{COV}(\hat{y}_j, \bar{y}_j) = \frac{1}{q} \sum_{j=1}^q (\hat{y}_j - \bar{\hat{y}}) * (\bar{y}_j - \bar{\bar{y}}) \quad \text{Ec(10)}$$

5. Calcular la varianza residual (error típico)

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^q (\bar{y}_j - (a + b * \hat{y}_j))^2}{q - 2}} \quad \text{Ec(11)}$$

Comprobar la linealidad

- Si $r_{\text{calculado}} > r_{\text{tabulado}}$ es lineal
 Si $r_{\text{calculado}} < r_{\text{tabulado}}$ no es lineal

La r_{tabulado} se obtiene del ANEXO 1.- TABLA DE SIGNIFICACIÓN DE "r", para lo cual se utilizan 4 grados de libertad ($n - 1 = 5 - 1 = 4$) y 95 % de confianza, lo que da un valor de $r = 0,811$.

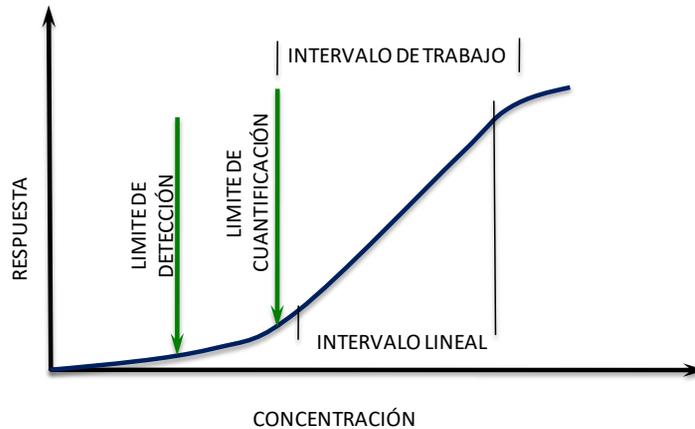
También se puede comprobar con la covarianza:

- Si $\text{COV} = 0$, el sistema está incorrelacionado
- $\text{COV} < 0$, el sistema tiene una proporcionalidad indirecta
- $\text{COV} > 0$, el sistema tiene una proporcionalidad directa

5.3.2 Límite de detección

El límite de detección de un analito se determina mediante el análisis los datos de la

linealidad, con la pendiente y el intercepto se podrá aplicar la siguiente fórmula:



$$LD = \frac{3a}{b} \quad \text{Ec(12)}$$

Siendo:

a = intercepto (ordenada en el origen) de la recta de regresión

b = pendiente de la recta de regresión

5.3.3 Límite de cuantificación

El límite de cuantificación de un analito se determina mediante el análisis los datos de la linealidad, con la pendiente y el intercepto se podrá aplicar la siguiente fórmula:

$$LC = \frac{10a}{b} \quad \text{Ec(13)}$$

Siendo:

a = intercepto (ordenada en el origen) de la recta de regresión

b = pendiente de la recta de regresión

Se puede determinar también el límite de cuantificación experimental o práctico, mediante la medida de 10 réplicas de muestras o estándar con una baja concentración del analito, posterior análisis de los datos y se obtención de la desviación estándar, que multiplicada por un factor que en general es 10.

$$LC_{EXP} = 10DS$$

Ec(14)

Siendo:

DS: la desviación estándar obtenida a partir de las 10 réplicas.

5.3.4 Rango de trabajo

Para cualquier método cuantitativo es necesario determinar el intervalo de concentraciones del analito o los valores de la propiedad relacionada, sobre los cuales el método puede aplicarse. Esto se refiere al intervalo de concentraciones o a los valores de la propiedad relacionada, de las disoluciones medidas realmente más que de las muestras originales. En el extremo inferior del intervalo de concentración, los factores limitantes son los valores del límite de detección y/o cuantificación. En el extremo superior del intervalo de concentración, las limitaciones serán impuestas por varios efectos que dependen del sistema de respuesta del instrumento.

El rango de trabajo se establece por las concentraciones mínima y máxima de la curva de linealidad.



5.3.5 Precisión

Normalmente, la “precisión” se determina para circunstancias específicas las cuales en la práctica pueden ser muy variadas. Las medidas de precisión más comunes son la “repetibilidad” y la “reproducibilidad”. Éstas representan las dos medidas extremas de precisión que pueden obtenerse.

La repetibilidad (la precisión más pequeña esperada) dará una idea de la clase de variabilidad esperada cuando un método se ejecuta por un solo analista, con un equipo en un período corto de tiempo, es decir, es la clase de variabilidad que se espera entre resultados cuando una muestra se analiza por duplicado.

Si la muestra se analiza por varios laboratorios para fines comparativos, entonces una medida de precisión más significativa a usarse es la reproducibilidad (ésta es la medida de precisión más grande normalmente encontrada, a pesar de que formalmente se excluye la variación con respecto del tiempo).

Puede ser que para algunos casos particulares sea más útil una medida intermedia de la precisión, por ejemplo la precisión medida entre diferentes ensayistas, en períodos de tiempo prolongados dentro de un solo laboratorio. Esto algunas veces se conoce como “**precisión intermedia**”, pero las condiciones exactas deberán ser especificadas. La precisión se determina por lo general en términos de la desviación estándar o la desviación estándar relativa. Tanto la reproducibilidad como la repetibilidad dependen generalmente de la concentración del analito y deben determinarse a varias concentraciones y de ser pertinente, deberá establecerse la relación entre la precisión y la concentración del analito.

La desviación estándar relativa puede ser más útil en este caso puesto que la desviación estándar dividida por la concentración es prácticamente constante dentro del intervalo de interés, a condición de que éste no sea demasiado grande.

Si la precisión depende de la concentración (no es constante en el rango de trabajo), en lugar de emplear la desviación estándar se debe emplear la desviación estándar relativa (coeficiente de variación), que viene dado por:

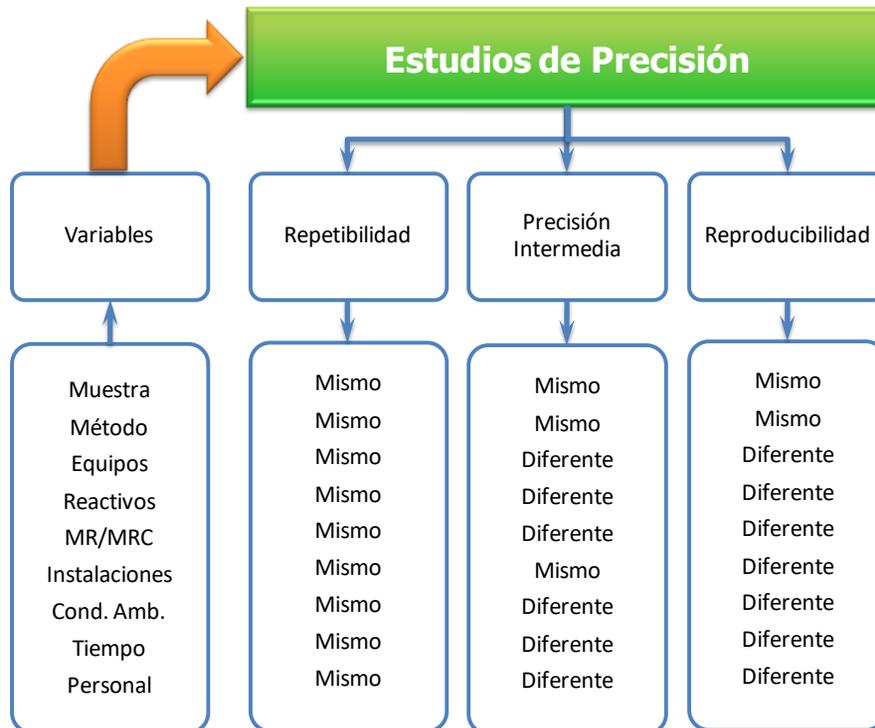
$$DRS \% = \frac{S_x}{\bar{X}} \times 100$$

Ec 15

DRS %: Desviación estándar relativa o coeficiente de variación

S_x : Desviación estándar

\bar{X} : Valor medio de las lecturas obtenidas



Condiciones de Repetibilidad (S_r), Precisión Intermedia (S_w), Reproducibilidad (S_R)

5.3.5.1 Repetibilidad y Reproducibilidad

Para determinar la repetibilidad y precisión intermedia se recomienda lo siguiente:

- Realizar mediciones dentro del intervalo lineal en distintas concentraciones.
- Realizar mediciones en muestras naturales en condiciones de repetibilidad y precisión intermedia.
- Realizar al menos 5 mediciones, al menos por duplicado para cada nivel de concentración

5.3.5.2 Calculo de la Repetibilidad y Precisión Intermedia

Para calcular la repetibilidad y la reproducibilidad:

- 1º Calcular la media.
- 2º Calcular la desviación estándar.
- 3º Calcular la desviación estándar relativa como en Ecuación 15.

5.3.6 Exactitud

La validación de un método busca cuantificar la exactitud probable de los resultados evaluando tanto los efectos sistemáticos como los aleatorios sobre los resultados. Normalmente la exactitud se estudia en dos componentes: la “veracidad” y la “precisión”. La veracidad (de un método) es una expresión de que tan cercana se encuentra la media de un conjunto de resultados (producidos por el método) respecto del valor real.

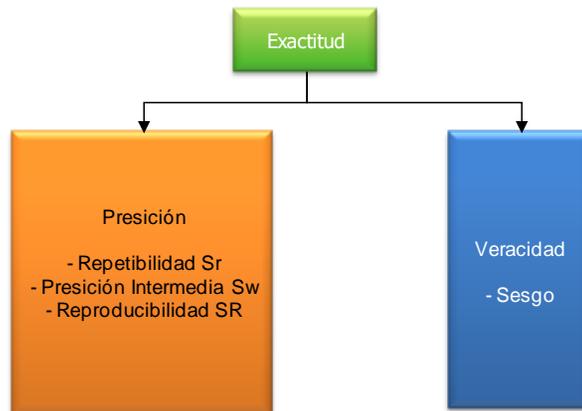
Normalmente, la veracidad se expresa en términos de sesgo. La “precisión” es una medida de que tan cercanos están los resultados unos con respecto a los otros y por lo general se expresa mediante medidas tal como la desviación estándar la cual describe la dispersión de los resultados.

5.3.6.1 Veracidad

La evaluación práctica de la veracidad se fundamenta en la comparación de la media de los resultados de un método con relación a valores conocidos, es decir, la veracidad se determina

contra un valor de referencia (o sea, un valor verdadero o un valor verdadero convencional).

Se dispone de dos técnicas básicas: la verificación con respecto a los valores de referencia de un material caracterizado o de otro método caracterizado. Los valores de referencia son idealmente trazables a patrones internacionales. Los materiales de referencia certificados por lo general se aceptan como medio de proveer valores trazables y por lo tanto, el valor de referencia es el valor certificado del MRC. Los valores de referencia, certificados u otros pueden ser absolutos (trazables al SI) o convencionales, es decir, que son acordados para un propósito en particular.



Claramente la disponibilidad de estos materiales es limitada. Los materiales de referencia para una validación pueden ser por consiguiente:

- Preparados por adición de materiales típicos con materiales de referencia de pureza certificada u otros materiales de pureza y estabilidad adecuadas.
- Materiales típicos bien caracterizados, de estabilidad verificada internamente y conservados para control de calidad interno.

La validación requiere la adecuación a un propósito, por lo tanto, la selección de un material de referencia puede depender del uso pretendido. El material de referencia debe ser apropiado para su uso. Para trabajos de normalización debe usarse un material de referencia certificado adecuado e idealmente de la misma matriz.

5.3.6.2 Valor de referencia

Existen las siguientes posibilidades para obtener los valores de referencia:

1. Referencia Externa: La referencia puede consistir en:
 - Material de Referencia Certificado (MRC)
 - Material de Referencia (MR) o Estándar Primario
 - Muestra Obtenida a partir de un ejercicio de intercomparación
2. Comparación de Métodos
 - Comparación Interna: Determinaciones de un analito con distintos métodos en el mismo laboratorio.
 - Comparación Externa: Mediante los ejercicio de intercomparación.
3. Método de Adición (fortificación):

Consiste en añadir una cantidad conocida de MR o MRC y evaluar el grado de recuperación de las mismas y de esta manera determinar el valor de referencia de la muestra:

5.3.6.3 Diseño Experimental Exactitud



Para la determinación de la exactitud se puede aplicar:

Realizar ensayos de fortificación con MR o MRC, al menos en tres niveles de concentración diferentes dentro de la curva de calibración, cada uno al menos por duplicado.

5.3.6.3.1 % de Recuperación

Se calculan los porcentajes de recuperación y de error, que son, respectivamente, las relaciones porcentuales entre el valor obtenido y el teórico, y entre la diferencia entre éstos y el valor teórico.

$$\% \text{ recuperación} = \frac{\text{Valor obtenido}}{\text{Valor teórico}} \times 100$$

$$\% \text{ error} = \frac{|\text{Valor obtenido} - \text{Valor teórico}|}{\text{Valor teórico}} \times 100 = |100 - \% \text{ recuperación}|$$

5.3.7 Selectividad/ especificidad

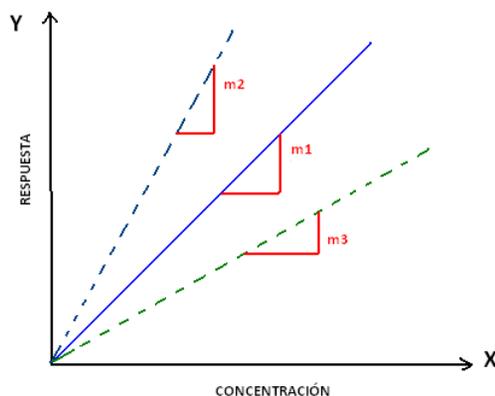
En general, se dice que los métodos analíticos consisten de una etapa de medición la cual puede o no ser precedida de una etapa de separación. Es necesario establecer que la señal producida en la etapa de medición o alguna otra propiedad medida, la cual se atribuye al analito, se debe únicamente al analito y no a la presencia de algo química o físicamente similar o que surja como una coincidencia. Esta es la confirmación de la identidad.

La interferencia de otros compuestos en la medición del analito, dependerá de la efectividad de la etapa de separación y de la selectividad/especificidad de la etapa de medición.

La selectividad y la especificidad son medidas que garantizan la confiabilidad de las mediciones en presencia de interferencias.

La especificidad se considera generalmente que es el 100 % de la selectividad pero el acuerdo no es universal. Si la etapa de medición no es específica, es posible declarar que ciertos analitos no interfieren, habiendo primero verificado que éste es el caso. Es bastante difícil establecer que nada interfiere ya que siempre existe la posibilidad de encontrar alguna interferencia no reconocida hasta el momento. Habrá casos en que ciertas interferencias químicas podrían ser identificadas por un método en particular pero que la oportunidad de encontrarlas en la vida real sea improbable.

Si hay interferencias presentes y no pueden separarse del analito de interés o si el analista no está consciente de su presencia, entonces esas interferencias tendrán varios efectos. Dependiendo de como se establece la identidad del analito, las interferencias pueden inhibir la confirmación, por ejemplo, al distorsionar la señal que surge del analito. Las interferencias también pueden tener el efecto de incrementar aparentemente la concentración del analito al contribuir a la señal atribuida a él, (o contrariamente, disminuir la concentración del analito si contribuye con una señal negativa). Por lo general, las interferencias afectarán la



pendiente de la curva de calibración de una forma diferente a la que lo haría el analito de interés, así, la pendiente de la curva de calibración en el método de adiciones puede afectar la linealidad de la curva. Este efecto tiene el potencial para indicar la posible presencia de una interferencia oculta, pero no es útil si la curva de recuperación es inherentemente no lineal.

Usualmente, la selectividad de un método se investiga mediante el estudio de su capacidad para medir el analito de interés en porciones de prueba a las cuales deliberadamente se han introducido interferencias específicas (aquellas que se cree probable estén presentes en las muestras). Si no se está seguro de que las interferencias están presentes, la selectividad de un método se puede investigar estudiando su capacidad de medir el analito comparado con otros métodos o técnicas independientes.

Las pruebas a realizar para asegurar la selectividad o especificidad del método podrán ser diferentes en función del tipo de muestra a ensayar, la técnica utilizada, la información bibliográfica disponible, etc.

5.3.7.1 Pruebas de Selectividad/Especificidad más utilizadas:

- Método de adiciones mediante adición de un MR o MRC (Fortificaciones).
- Trabajar con los datos del proceso de verificación del modelo lineal, en este caso si el modelo es lineal la pendiente debe ser constante en todo el rango de trabajo, esto muestra que el método es selectivo/específico en dicho rango.
- Ensayos de muestras que contenga el analito en cuestión y además otro analito diferente.

5.3.8 Sensibilidad

En una regresión lineal la sensibilidad corresponde a la pendiente (b o m) de la recta de calibración. La pendiente se obtiene de la curva de linealidad de la siguiente ecuación $Y = bx + a$, donde b es la pendiente.

Para las pruebas de sensibilidad se preparan al menos dos curvas de calibraciones, una con concentraciones menores y la otra con concentraciones mayores respecto a las concentraciones utilizadas para la determinación de la curva de linealidad del método.

Se dice que un método es sensible cuando una pequeña variación de concentración determina una gran variación de respuesta. La sensibilidad permite observar la capacidad de respuesta instrumental frente a una determinada cantidad de analito. En el tiempo, se visualiza cómo se comporta el instrumento.

5.3.9 Sesgo o error

Para determinar el sesgo o error de un método se puede utilizar:

- MRC.
- MR.
- Material fortificado.
- Material de Ensayo de aptitud.

Para este fin se puede medir un analito de concentración conocida y se determina la diferencia en Valor Absoluto, entre el valor conocido y la media del valor obtenido. Una diferencia sistemática importante en relación al valor de referencia aceptado se refleja en un mayor valor del sesgo, cuanto menor es el sesgo mayor es la veracidad indicada en el método.

$$s = X - X_a$$

Donde

s= sesgo

X= Lectura obtenida o valor promedio de las lecturas obtenidas.

X_a= Valor asignado, valor certificado del MR o valor esperado.

5.3.10 Robutez

Para determinar la robustez de un método se aplica el Test de Youden y Steiner. Para realizar el estudio de la robustez se deben identificar aquellos factores del método que posiblemente afectarían el resultado de un ensayo.

Estos factores están presentes habitualmente en el método (ejemplo: temperatura, composición de la fase móvil o soluciones reactivas, pH de la solución, flujo, etc). Para este estudio se procede a exponer cada factor a un estudio de variable, es decir, se expone a una variable respecto a la establecida en el método, cada variable se estudia mediante un valor alto (A, B, C.....) y su modificación a un valor bajo (a, b, c.....). Una vez establecidos estos valores se diseñan pruebas de ensayo.

Valor de la condición variable	Análisis							
	1	2	3	4	5	6	7	8
A, a	A	A	A	A	a	a	a	a
B, b	B	B	B	B	B	b	b	b
C, c	C	C	C	C	C	c	C	c
D, d	D	D	d	D	d	d	D	D
Resultados	s	T	u	V	w	x	y	z

Entre las condiciones analíticas que se podrían alterar en un método se encuentran: analistas, equipos, reactivos, pH, temperatura, flujo, tiempo de reacción, estabilidad de la muestra, entre otros. Ejemplo:

Condiciones-Variabes	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4	Muestra 5	Muestra 6	Muestra 7	Muestra 8
Temperatura de columna	40 ° C	40 ° C	40 ° C	40 ° C	30 ° C	30 ° C	30 ° C	30 ° C
Flujo (mL/min)	1,5	1,5	1,5	1,2	1,5	1,2	1,2	1,2
Volumen de inyección(µL)	20	10	20	10	20	10	20	10
Tiempo de agitación (min)	15	15	10	10	10	10	15	15
Resultados	49,01 %	24,58 %	48,89 %	24,76 %	49,53 %	24,92 %	49,64 %	24,94 %



VALIDACIÓN, VERIFICACIÓN DE MÉTODOS Y CÁLCULO DE INCERTIDUMBRE

Código: PRO-DLQ-106
Emisor: DGT-DL-DLQ
Versión: 01
Vigente: 08/05/2023
Página: 14 de 23

--	--	--	--	--	--	--	--	--

A partir de los resultados puede calcularse cada una de las variables, calculando el promedio de los análisis que contienen la variable en su valor más alto (A, B, C, D) y aquellas que corresponden a su valor más bajo (a, b, c, d). Así para evaluar el efecto de la primera variable, se observa:

$$\frac{(s+t+u+v)}{4} = 4 A = A$$

4 4

$$\frac{(w+x+y+z)}{4} = 4 a = a$$

4 4

Se deben establecer las comparaciones posibles, es decir, las diferencias entre las variables de mayor valor entre las variables de menor valor:

$$(A-a), (B-b), (C-c) \text{ y } (D-d)$$

En este sentido cuanto mayor sea la diferencia entre los resultados, del valor mayor y el valor menor ($\Delta=X-x$), mayor influencia tendrá dicha variable sobre el método analítico.

Como criterio de aceptación para la robustez del método se considera que la diferencia entre el valor alto y el valor bajo sea superior a $\sqrt{2}$ de la desviación estándar de la precisión del método S:

$$(X-x) < \sqrt{2}S$$

Ejemplo:

Valor Alto X	Valor Bajo x	Promedio X	Promedio x	Diferencia $\Delta(X-x)$	Comparación $\Delta < \sqrt{2} DS$
A	a	36,81	37,26	0,45	No sensible a variable
B	b	43	31,06	11,94	No sensible a variable
C	c	49,27	24,8	24,47	Sensible a variable
D	d	37,04	37,03	0,01	No sensible a variable

Las variables que se consideran sensibles en el estudio de robustez, no deberán modificarse en el método analítico, deben mantenerse los parámetros establecidos en dicho método.

5.3.11 Bondad de ajuste

Se refiere a una prueba estadística que determina qué tan bien los datos de la muestra se ajustan a una distribución en una población con una distribución normal. En pocas palabras, asume si una muestra está distorsionada o representa los datos que esperaría encontrar en la población real.

La bondad de ajuste es un término que describe que tan bien un set de datos se adapta al ajuste de curva. La bondad de ajuste utilizando la regresión lineal es comúnmente evaluada por el valor de R2 (Motulsky 1996). Cuando se utiliza la regresión logística, hay otro parámetro estadístico para medir la bondad de ajuste, tal como la probabilidad de ajuste y la varianza residual. Dos métodos más prácticos para medir la bondad de ajuste son típicamente utilizados, recuperación de estándar y recuperación de fortificado.

Un método práctico para evaluar la calidad del ajuste de la curva es el de calcular la concentración de los estándares después de que la regresión se haya completado (Nix y Wild 2001, Baud 1993). Este procedimiento se conoce también como recuperación de



estándares se realiza calculando la concentración de cada estándar y comparándola con la concentración real utilizando la fórmula:

$(\text{Concentración Observada}/\text{Concentración Real}) \times 100$

Este método da lugar a información sobre el error relativo en el cálculo de las muestras.

Es más conveniente que cada estándar posea un valor entre los 70 a 130% de recuperación.

5.4 Medición de la incertidumbre

La medición de la incertidumbre guarda relación con la “incertidumbre” asociada con los datos generados por un proceso de medición. En química analítica, se define generalmente como la incertidumbre asociada con el proceso de laboratorio, pero puede incluir también un componente de incertidumbre asociado con el muestreo.

Por tanto, la “estimación” de la incertidumbre describe el espectro en torno a un resultado comunicado o experimental dentro del cual puede esperarse que se encuentre el valor real dentro de un nivel definido de probabilidad. Se trata de un concepto diferente a la medición del error, que puede definirse como la diferencia entre un resultado individual y el valor verdadero. Comunicando la incertidumbre se pretende proporcionar un mayor nivel de confianza en la validez del resultado comunicado.

5.4.1 Componentes de la incertidumbre

Los valores resultantes de medición de la magnitud “y” dependen de una serie de valores de entrada x_i ($i = 1 \dots n$) según una función:

$$y = G(x_1, \dots, x_n)$$

Estos valores de entrada provienen de muy diversas fuentes: certificados de materiales de referencia, certificados de calibración de equipos de medida, proceso de medida, magnitudes de influencia, correcciones a realizar, etc. Es decir, todos aquellos factores que afectan a las mediciones.

Por ello, el cálculo de incertidumbre de cada método se va a realizar con los resultados obtenidos del proceso de validación de cada laboratorio.

Los componentes principales de la incertidumbre de nuestros métodos son:

- A. **u(P) o U(Rep):** componente debido a la incertidumbre de la precisión. Se calcula como la desviación estándar del resultado del estudio de precisión (reproducibilidad).
- B. **u(R) o U(Ex):** componente debido a la incertidumbre de la exactitud de la medida. Se estima en función de un factor R definido como la relación entre el valor de concentración observada y esperada.

5.4.2 Los pasos en la cuantificación de la incertidumbre asociada a un método para una determinada concentración serán:

- A. **Cuantificación de la contribución de la precisión. Cálculo de u(P) o U(Rep):**

En cada uno de los experimentos realizados en la validación se obtendrá un valor medio de concentración para cada uno de los controles. Se calcula la media de los resultados de todos los experimentos, la desviación estándar y la desviación estándar relativa.



La incertidumbre relativa debida a la precisión del método para esa concentración será la desviación estándar relativa.

$$U_{Rep} = \frac{DS}{\sqrt{n}}$$

B. Cuantificación de la contribución de la exactitud. Cálculo de $u(R)$ o $U(ex)$:

En la validación, la exactitud se estima en términos de recuperación, es decir, como el cociente entre el valor observado y el valor teórico.

$$U_{Ex} = \frac{DS}{\sqrt{n}}$$

C. Cuantificación de la contribución de la balanza U_{bal}

La incertidumbre atribuida a la balanza se calcula considerando la incertidumbre de la balanza y el factor de cobertura, especificados en el Certificado de Calibración de la misma.

$$U_{Bal} = \frac{U_b}{K}$$

Cuando el Certificado de Calibración de la balanza no posee la incertidumbre y el factor de cobertura, se estima teniendo en cuenta las especificaciones del equipo, tales como el error y la resolución.

$$U_{bal} = U_{err} + U_{resol}$$

$$U_{bal} = \frac{Error}{\sqrt{3}}$$

$$U_{bal} = \frac{Resolución}{\sqrt{6}}$$

D. Cuantificación de la contribución del MRC U_{MRC}

La incertidumbre atribuida al MRC se calcula considerando la incertidumbre del método analítico y el factor de cobertura, especificados en el Certificado de Calidad de la misma.

$$U_{MRC} = \frac{U_C}{K}$$

E. Cuantificación de la contribución del MR U_{MR}

La incertidumbre atribuida al MR se calcula considerando la incertidumbre del método analítico y el factor de cobertura, especificados en el Certificado de Calidad de la misma.

$$U_{MR} = \frac{U_C}{K}$$

Cuando el Certificado del MR o estándar primario no especifica la incertidumbre, la misma se estima teniendo en cuenta la pureza del mismo.

$$U_{MR} = U_{Pur}$$

$$U_{MR} = \frac{Pureza}{\sqrt{3}}$$

Ejemplo: El Certificado de Calidad del MR o estándar primario especifica que la pureza del mismo es 99 %, la incertidumbre se calcula de la siguiente manera:

$$U_{MR} = \frac{1}{\sqrt{3}}$$

F. Cuantificación de la contribución de los materiales volumétricos U_{Vol}

La incertidumbre de los materiales volumétricos calibrados se calcula considerando la incertidumbre y el factor de cobertura, especificados en el Certificado de Calibración de la misma.

$$U_{Vol} = \frac{U_v}{k}$$

Cuando no se cuente con Certificado de Calibración de los materiales volumétricos, la incertidumbre se estima teniendo en cuenta el error de cada material volumétrico (pipetas, micropipetas, matraces, picnómetros).

$$U_{Vol} = U_{err}$$

$$U_{vol} = \frac{Error}{\sqrt{3}}$$

G. Cuantificación de la contribución de la curva de calibración U_{xy}

$$U_{YX} = \frac{S}{b_1} \sqrt{\left(\left(\frac{1}{p} \right) + \left(\frac{1}{n} \right) + \frac{\left((Y_{(x)j} - \hat{Y}_{MRC})^2 \right)}{S_{xx}} \right)}$$

Donde:

$U_{(YX)}$: Incertidumbre del mesurando

S: Desviación estándar residual del cálculo de regresión lineal

b_1 : pendiente de la recta

p: número de réplicas

n: número de disoluciones (puntos) empleados en la curva de calibración multiplicado por el número de réplicas (lecturas) de cada disolución (punto), total de datos

$Y_{(x)j}$: Concentración de la masa en estudio

\hat{Y}_{MRC} : Promedio de las concentraciones de masa de las disoluciones empleadas en la curva de calibración

S_{xx} : Suma de los cuadrados de los residuales de las concentraciones obtenidas

H. Contribuciones a la incertidumbre no significativas

Se considera como no significativa a aquella contribución a la incertidumbre cuya magnitud es igual o menor a un tercio de la contribución más significativa.

I. Cálculo de la incertidumbre combinada total.

La incertidumbre combinada total U_{CT} se calcula como:

$$U_{CT} = \sqrt{(U_{Rep})^2 + (U_{Ex})^2 + (U_{Bal})^2 + (U_{MRC})^2 + (U_{MR})^2 + (U_{Vol})^2 + (U_{cc})^2}$$

Para sumar todas las contribuciones de incertidumbre se deben volver adimensionales a cada una de ellas, de la siguiente manera:

$$U_{Rep} = \frac{U_{Rep}}{\text{Media de las concentraciones}}$$

$$U_{Ex} = \frac{U_{Ex}}{\text{Media de las recuperaciones}}$$

$$U_{bal} = \frac{U_{bal}}{\text{Media de los pesos}}$$

$$U_{MRC} = \frac{U_{MRC}}{\% \text{ Pureza}}$$

$$U_{MR} = \frac{U_{MR}}{\% \text{ Pureza}}$$

$$U_{Vol} = \frac{U_{Vol}}{\text{Valor nominal}}$$

Ucc: Es la incertidumbre obtenida a partir de la curva de calibración

J. Cálculo de la incertidumbre expandida (u).

La incertidumbre combinada total obtenida en el punto anterior se debe multiplicar por un factor de cobertura k apropiado y la concentración de la muestra obtenida en la recuperación para obtener la incertidumbre expandida. La incertidumbre expandida representa un intervalo en el que estarán incluidos la mayoría de los valores que se pueden atribuir razonablemente al mensurando.

Se utiliza un factor de cobertura $k=2$, lo que significa que el intervalo establecido contiene aproximadamente el 95% de los valores de la distribución.

$$u_{exp} = \pm(U_{CT} \times C_{\%R} \times k)$$

5.5 Registros de validación y Resultados

Todos los datos generados durante la validación de una metodología de ensayo (parámetros de validación, procesamiento de las muestras, equipos y materiales utilizados, cálculos, etc) se registran en el FOR-DLQ-152 Hoja de Cálculo de Validación de Métodos, FOR-DLQ-153 Plan de Validación de Métodos y en el FOR-DLQ-154 Informe de Validación de Métodos”.

En el FOR-DLQ-153 “Plan de Validación de Métodos” debe describir cómo realizará la validación, verificación y cálculos de incertidumbre, debe especificar los criterios que utilizará para aceptar o rechazar los resultados de cada parámetro de la validación dependiendo de la metodología utilizada y dependiendo de cada Laboratorio.

Para el LCC, sus criterios son:

Repetibilidad: %DRS \leq 2%

Reproducibilidad: %DRS \leq 2%

Según la Guidelines on method validation to be performed in support of analytical methods for agrochemical formulations, el porcentaje de recuperación aceptable es 98 – 102%, y el sesgo o error no debe superar el 2%.

5.6 Expresión de la incertidumbre y cifras significativas

Se expresa con dos cifras significativas, redondeando el valor promedio de la medición.



VALIDACIÓN, VERIFICACIÓN DE MÉTODOS Y CÁLCULO DE INCERTIDUMBRE

Código: PRO-DLQ-106
Emisor: DGT-DL-DLQ
Versión: 01
Vigente: 08/05/2023
Página: 19 de 23

6. CONTROL DE CAMBIOS

Ítem	Página	Cambios
NA	1	Proviene de un Sistema de Gestión de Calidad de la Norma NP-ISO/IEC 17025:2018. La DL adopta el SGCI del SENAVE en cumplimiento de la Resolución SENAVE N° 230/2023 "Control de documentos", versión 05. Se realiza el cambio al SGCI del PRO-DLQ-106 Ver: 13 Vigencia: 25/05/2020, pasa a la versión 01, teniendo en cuenta lo establecido en la Nota 02 del PRO-DSGC-001 "Control de documentos".

7. REFERENCIAS

7.1 Resolución N° 230/2023 "Por la cual se actualiza el procedimiento para el "Control de Documentos", para la elaboración, verificación, aprobación y autorización de documentos relacionados al ámbito del sistema de gestión de calidad (SGC) del Servicio Nacional de Calidad y Sanidad Vegetal y de Semillas (SENAVE), y se abroga la resolución SENAVE N° 042/23 de fecha 30 de enero de 2023".

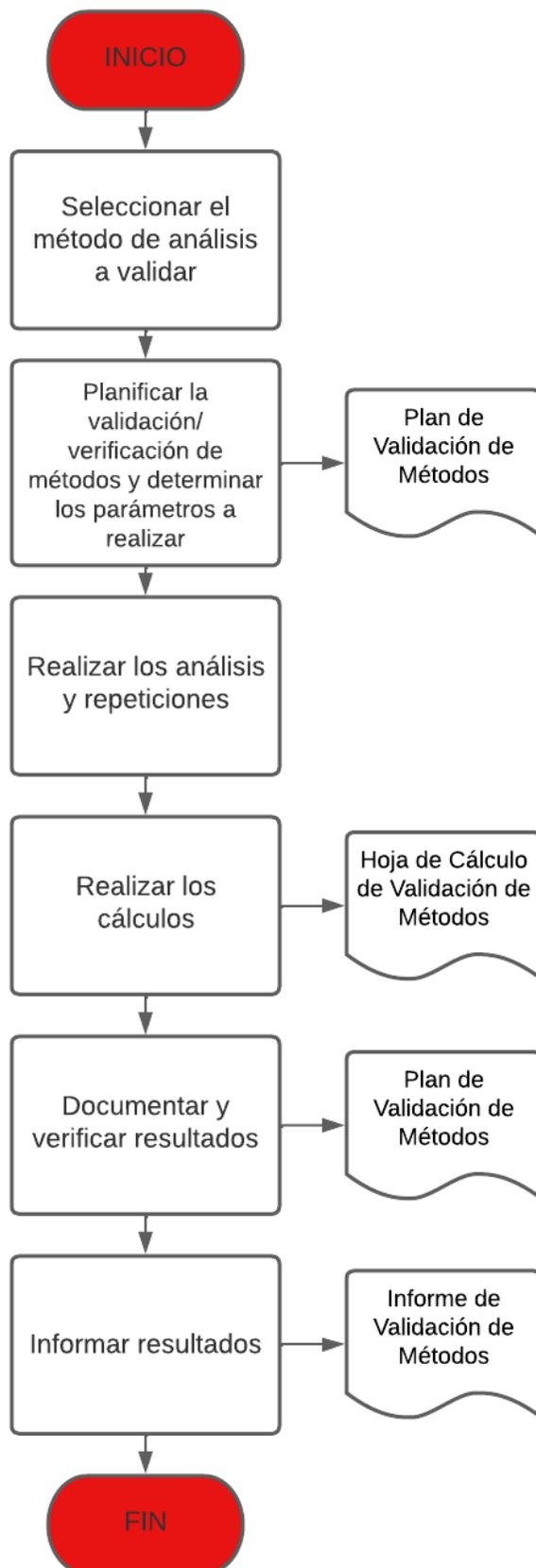
7.2 Guidelines on method validation to be performed in support of analytical methods for agrochemical formulations.

8. DOCUMENTOS

Nombre del Registro	Código	Área de archivo	Responsable	Tiempo de retención por dependencia	Disposición Final
Hoja de Cálculo de Validación de Métodos	FOR-DLQ-152	DLQ	Técnicos	Indefinido	No aplica
Plan de Validación de Métodos	FOR-DLQ-153	DLQ	Técnicos	Indefinido	No aplica
Informe de Validación de Métodos	FOR-DLQ-154	DLQ	Técnicos	Indefinido	No aplica

9. ANEXOS

9.1 Flujograma



9.2 Tabla de Significación de "r"

N-1	0.1	0.05	0.01	0.001
1	0.988	0.997	1.000	1.000
2	0.900	0.950	0.990	0.999
3	0.805	0.878	0.959	0.991
4	0.729	0.811	0.917	0.974
5	0.669	0.755	0.875	0.951
6	0.622	0.707	0.834	0.925
7	0.582	0.666	0.798	0.898
8	0.549	0.632	0.765	0.872
9	0.521	0.602	0.735	0.847
10	0.497	0.576	0.708	0.823
11	0.476	0.553	0.684	0.801
12	0.458	0.532	0.661	0.780
13	0.441	0.514	0.641	0.760
14	0.426	0.497	0.623	0.742
15	0.412	0.482	0.606	0.725
16	0.400	0.468	0.590	0.708
17	0.389	0.456	0.575	0.693
18	0.378	0.444	0.561	0.679
19	0.369	0.433	0.549	0.665
20	0.360	0.423	0.537	0.652
21	0.352	0.413	0.526	0.640
22	0.344	0.404	0.515	0.629
23	0.337	0.396	0.505	0.618
24	0.330	0.388	0.496	0.607
25	0.323	0.381	0.487	0.597
26	0.317	0.374	0.479	0.588
27	0.312	0.367	0.471	0.579
28	0.306	0.361	0.463	0.570
29	0.301	0.355	0.456	0.562
30	0.296	0.349	0.449	0.554
35	0.275	0.325	0.418	0.519
40	0.257	0.304	0.393	0.490
45	0.243	0.288	0.372	0.485
50	0.231	0.273	0.354	0.443
55	0.220	0.261	0.339	0.425
60	0.211	0.250	0.325	0.408
70	0.195	0.232	0.302	0.380
80	0.183	0.217	0.283	0.357
90	0.173	0.205	0.267	0.338
100	0.164	0.195	0.254	0.321
120	0.150	0.178	0.232	0.294
150	0.134	0.159	0.208	0.254
200	0.116	0.138	0.181	0.230



**VALIDACIÓN, VERIFICACIÓN DE MÉTODOS Y
CÁLCULO DE INCERTIDUMBRE**

Código: PRO-DLQ-106
Emisor: DGT-DL-DLQ
Versión: 01
Vigente: 08/05/2023
Página: 22 de 23

9.3 Valores tabulados de “C” para el TEST DE COCHRAN’S a 1% y 5% de probabilidad

p	n=2		n=3		n=4		n=5		n=6	
	1%	5%	1%	5%	1%	5%	1%	5%	1%	5%
2	---	---	0,995	0,975	0,979	0,939	0,959	0,906	0,937	0,877
3	0,993	0,967	0,942	0,871	0,883	0,798	0,834	0,746	0,793	0,707
4	0,968	0,906	0,864	0,768	0,781	0,684	0,721	0,629	0,676	0,590
5	0,928	0,841	0,788	0,684	0,696	0,598	0,633	0,544	0,588	0,506
6	0,883	0,781	0,722	0,616	0,626	0,532	0,564	0,480	0,520	0,445
7	0,838	0,727	0,664	0,561	0,568	0,480	0,508	0,431	0,466	0,397
8	0,794	0,680	0,615	0,516	0,521	0,438	0,463	0,391	0,423	0,360
9	0,754	0,638	0,573	0,478	0,481	0,403	0,425	0,358	0,387	0,329
10	0,718	0,602	0,536	0,445	0,447	0,373	0,393	0,331	0,357	0,303
11	0,684	0,570	0,504	0,417	0,418	0,348	0,366	0,308	0,332	0,281
12	0,653	0,541	0,475	0,392	0,392	0,326	0,343	0,288	0,310	0,262
13	0,624	0,515	0,450	0,371	0,369	0,307	0,322	0,271	0,291	0,243
14	0,599	0,492	0,427	0,352	0,349	0,291	0,304	0,255	0,274	0,232
15	0,575	0,471	0,407	0,335	0,332	0,276	0,288	0,242	0,259	0,220
16	0,553	0,452	0,388	0,319	0,316	0,262	0,274	0,230	0,246	0,208
17	0,532	0,434	0,372	0,305	0,301	0,250	0,261	0,219	0,234	0,198
18	0,514	0,418	0,356	0,293	0,288	0,240	0,249	0,209	0,223	0,189
19	0,496	0,403	0,343	0,281	0,276	0,230	0,238	0,200	0,214	0,181
20	0,480	0,389	0,330	0,270	0,265	0,220	0,229	0,192	0,205	0,174
21	0,465	0,377	0,318	0,261	0,255	0,212	0,220	0,185	0,197	0,167
22	0,450	0,365	0,307	0,252	0,246	0,204	0,212	0,178	0,189	0,160
23	0,437	0,354	0,297	0,243	0,238	0,197	0,204	0,172	0,182	0,155
24	0,425	0,343	0,287	0,235	0,230	0,191	0,197	0,166	0,176	0,149
25	0,413	0,334	0,278	0,228	0,222	0,185	0,190	0,160	0,170	0,144
26	0,402	0,325	0,270	0,221	0,215	0,179	0,184	0,155	0,164	0,140
27	0,391	0,316	0,262	0,215	0,209	0,173	0,179	0,150	0,159	0,135
28	0,382	0,308	0,255	0,209	0,202	0,168	0,173	0,146	0,154	0,131
29	0,372	0,300	0,248	0,203	0,196	0,164	0,168	0,142	0,150	0,127
30	0,363	0,293	0,241	0,198	0,191	0,159	0,164	0,138	0,145	0,124
31	0,355	0,286	0,235	0,193	0,186	0,155	0,159	0,134	0,141	0,120
32	0,347	0,280	0,229	0,188	0,181	0,151	0,155	0,131	0,138	0,117
33	0,339	0,273	0,224	0,184	0,177	0,147	0,151	0,127	0,134	0,114
34	0,332	0,267	0,218	0,179	0,172	0,144	0,147	0,124	0,131	0,111
35	0,325	0,262	0,213	0,175	0,168	0,140	0,144	0,121	0,127	0,108
36	0,318	0,256	0,208	0,172	0,165	0,137	0,140	0,118	0,124	0,106
37	0,312	0,251	0,204	0,168	0,161	0,134	0,137	0,116	0,121	0,103
38	0,306	0,246	0,200	0,164	0,157	0,131	0,134	0,113	0,119	0,101
39	0,300	0,242	0,196	0,161	0,154	0,129	0,131	0,111	0,116	0,099
40	0,294	0,237	0,192	0,158	0,151	0,126	0,128	0,108	0,114	0,097

9.4 Valores tabulados de “G” para el TEST DE GRUBB’S a 1% y 5% de probabilidad

p	Prueba simple de un solo valor alejado		Prueba doble de dos valores alejados	
	Arriba de 1%	Arriba de 5%	Bajo 1%	Bajo 5%
3	1,155	1,154	---	---
4	1,496	1,481	0,0000	0,0002
5	1,764	1,715	0,0018	0,0090
6	1,973	1,887	0,0116	0,0349
7	2,139	2,020	0,0308	0,0708
8	2,274	2,127	0,0563	0,1101
9	2,387	2,215	0,0851	0,1492
10	2,482	2,290	0,1150	0,1864
11	2,564	2,355	0,1448	0,2213
12	2,636	2,412	0,1738	0,2537
13	2,699	2,462	0,2016	0,2836
14	2,755	2,507	0,2280	0,3112
15	2,806	2,548	0,2530	0,3367
16	2,852	2,586	0,2767	0,3603
17	2,894	2,620	0,2990	0,3822
18	2,932	2,652	0,3200	0,4025
19	2,968	2,681	0,3398	0,4214
20	3,001	2,708	0,3585	0,4391
21	3,031	2,734	0,3761	0,4556
22	3,060	2,758	0,3927	0,4711
23	3,087	2,780	0,4019	0,4857
24	3,112	2,802	0,4234	0,4994
25	3,135	2,822	0,4376	0,5123
26	3,158	2,841	0,4510	0,5245
27	3,179	2,859	0,4638	0,5360
28	3,199	2,876	0,4759	0,5470
29	3,218	2,893	0,4875	0,5574
30	3,236	2,908	0,4985	0,5672
31	3,253	2,924	0,5091	0,5766
32	3,270	2,938	0,5192	0,5856
33	3,286	2,952	0,5288	0,5941
34	3,301	2,965	0,5381	0,6023
35	3,316	2,978	0,5469	0,6101
36	3,330	2,991	0,5554	0,6175
37	3,343	3,003	0,5636	0,6247
38	3,356	3,014	0,5714	0,6316
39	3,369	3,025	0,5789	0,6382
40	3,381	3,036	0,5862	0,6445