

## **1. Introducción.**

La validación ha sido objeto de atención por ser requerida en Normas sobre Sistemas de Gestión de la Calidad, sobre software y particularmente en la Norma ISO/IEC 17025:2005 sobre requisitos generales para laboratorios de calibración y ensayo.

La aplicabilidad del requisito sobre validación de métodos, particularmente en la Norma ISO/IEC 17025:2005, ha sido frecuentemente materia de controversia dado que cabe la interpretación de que cuando se menciona o se describe un método en una Norma, entonces denominado método normalizado, no es ya necesaria la validación del mismo.

El propósito de este trabajo es discutir el concepto de validación, los elementos que lo constituyen y los procesos para llevarla a cabo, con el objetivo de reducir las controversias respecto a este tema.

Para que un resultado analítico concuerde con el propósito requerido, debe ser lo suficientemente confiable para que cualquier decisión basada en éste pueda tomarse con confianza. Así, el desempeño del método debe validarse y debe estimarse la incertidumbre del resultado a un nivel de confianza dado. La incertidumbre deberá ser evaluada y establecida de una forma que sea ampliamente reconocida, consistente de forma interna y fácil de interpretar. La mayor parte de la información requerida para evaluar la incertidumbre se puede obtener durante la validación del método.

La validación es el proceso establecido para la obtención de pruebas documentadas y demostrativas de que un método de análisis es lo suficiente fiable y reproducible para producir el resultado previsto dentro de intervalos o parámetros definidos y para el propósito requerido.

El siguiente documento ha sido elaborado con el apoyo del Comité Técnico de Validación quienes aportaron sus conocimientos en el tema con la finalidad de homologar y facilitar a los usuarios del servicio de acreditación las herramientas necesarias para dicho proceso.

## **2. Objetivos**

Establecer una guía mínima en la que se incluyen los requisitos, pero no limitados a lo que se indica en ella, para las actividades de validación de métodos de ensayo no normalizados, desarrollados o diseñados por el laboratorio, métodos normalizados empleados fuera del alcance previsto, ampliaciones y modificaciones de los métodos normalizados y para las verificaciones necesarias para confirmar que el laboratorio puede aplicar correctamente los métodos normalizados antes de utilizarlos para los ensayos. Sistematizar los procedimientos para la realización de la validación de los métodos de ensayo. Evitar las discrepancias respecto a cuándo validar y la extensión de la validación según sea el caso.

## **3. Alcance**

Esta guía la deben aplicar los laboratorios de ensayo acreditados por el OSA y los que soliciten la acreditación ante dicho organismo, los evaluadores y expertos técnicos que actúan en los procesos de acreditación, y a todos los métodos de ensayo establecidos dentro del alcance de acreditación.

#### **4. Referencias.**

- Norma NTS ISO/IEC 17025:2005 Requisitos generales para la competencia de laboratorios de ensayo y calibración.
- Vocabulario Internacional de Términos Básicos de Metrología (VIM), Tercera edición 2012.
- ISO 9000:2008 Sistema de Gestión de la Calidad – Conceptos y Vocabularios.
- Validación de métodos analíticos; Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria A.E.F.I., Barcelona marzo del 2001.
- Guía de Validación de Métodos Analíticos. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos. México Primera Edición mayo de 2002.
- Métodos Analíticos Adecuados a su propósito 2a Edición, EURACHEM, Publicación técnica CNM-MRD-PT-030, CENAM .
- La Adecuación al uso de los métodos analíticos, EURACHEM, 2da Edición Inglesa, 1ra Edición española, Eurolab España, 2016.
- Guía para la Validación de métodos de ensayo del OAA GUI-LE-03
- RTCA 67.04.54:10 – Alimentos y bebidas procesadas. Aditivos alimentarios.
- Criterios para la verificación de métodos fisicoquímicos farmacopéicos. COFEPRIS. Clave CCAYAC-CR-04/0 2014.
- Criterios para la validación interna y confirmación de métodos fisicoquímicos. COFEPRIS. Clave CCAYAC-CR-03/0. 2014.
- Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. (IUPAC Technical report), Vol 74 No 5 pp 835 – 855, 2002. IUPAC
- Validation of Analytical procedures: Text and methodology – ICH Harmonized tripartite guideline. November 2005.
- AOAC Guideline for single laboratory validation of chemical methods for dietary supplements and botanicals. 2002.

#### **5. Definiciones**

**Adecuación al propósito:** Grado al cual los datos producidos por un proceso de medición permiten a un Usuario tomar decisiones técnica y administrativamente correctas para un Propósito establecido. (Guía EURACHEM)

**Control de Calidad Interno:** Serie de procedimientos asumidos por el personal de un laboratorio para el continuo seguimiento de las operaciones y de los resultados de las mediciones con el fin de decidir si los resultados son lo suficientemente confiables como para ser emitidos. (Guía EURACHEM)

**Especificidad:** Capacidad de un método analítico para obtener una respuesta debida únicamente al analito de interés y no a otros componentes de la muestra.(Guía de validación de métodos analíticos, Colegio de Químicos Farmacéuticos Biólogos México, A.C.)

**Exactitud de una medición:** Es la proximidad de concordancia entre el resultado de una medición y el valor de referencia aceptado. (Guía EURACHEM)

**Incertidumbre de medida:** Parámetro no negativo que caracteriza la dispersión de los valores atribuidos a un mensurando, a partir de la información que se utiliza.

NOTA 1 — La incertidumbre de medida incluye componentes procedentes de efectos sistemáticos, tales como componentes asociadas a correcciones y a valores asignados a patrones, así como la incertidumbre debida a la definición. Algunas veces no se corrigen los efectos sistemáticos estimados y en su lugar se tratan como componentes de incertidumbre.

NOTA 2 — El parámetro puede ser, por ejemplo, una desviación típica, en cuyo caso se denomina incertidumbre típica de medida (o un múltiplo de ella), o una semiapertura con una probabilidad de cobertura determinada.

NOTA 3 — En general, la incertidumbre de medida incluye numerosas componentes. Algunas pueden calcularse mediante una evaluación tipo A de la incertidumbre de medida, a partir de la distribución estadística de los valores que proceden de las series de mediciones y pueden caracterizarse por desviaciones típicas. Los otros componentes, que pueden calcularse mediante una evaluación tipo B de la incertidumbre de medida, pueden caracterizarse también por desviaciones típicas, evaluadas a partir de funciones de densidad de probabilidad basadas en la experiencia u otra información.

NOTA 4 — En general, para una información dada, se sobrentiende que la incertidumbre de medida está asociada a un valor determinado atribuido al mensurando. Por tanto, una modificación de este valor supone una modificación de la incertidumbre asociada. VIM (2.26 (3.9)) 3ª edición

**Intervalo de confianza:** Intervalo en torno al valor estimado que contiene el valor real con una probabilidad determinada.

**Intervalo o Rango:** Se define como el intervalo entre la concentración superior e inferior para las cuales se ha demostrado la correcta precisión, exactitud y linealidad del método. (Validación de métodos analíticos; A.E.F.I.) 2001.

**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, el extremo superior del intervalo de trabajo está definido por las concentraciones a las cuales se observan anomalías significativas en la sensibilidad analítica. (Guía EURACHEM 1ra edición española, 2016).

**Intervalo lineal:** Es la capacidad de un método analítico para dar resultados que son directamente proporcionales a la concentración del analito dentro de un intervalo dado.

**Límite de detección:** El menor contenido que puede medirse con una certeza estadística razonable o La menor concentración del analito en una muestra que puede detectarse, pero no necesariamente cuantificarse bajo las condiciones establecidas de la prueba. (Guía EURACHEM).

**Límite de cuantificación:** La menor concentración de un analito que puede determinarse con una precisión (repetibilidad) y una exactitud aceptables bajo las condiciones establecidas de la prueba. (Guía EURACHEM)

**Linealidad:** Define la habilidad del método para obtener resultados de la prueba proporcionales a la concentración del analito. (Guía EURACHEM)

Nota: Se deduce que el intervalo lineal es el intervalo de concentraciones del analito dentro del cual los resultados de prueba obtenidos por el método son proporcionales a la concentración del analito.

**Material de Referencia (MR):** Material o sustancia en la cual uno o más valores de sus propiedades son suficientemente homogéneos y bien definidos como para ser utilizados en la calibración de aparatos, en la evaluación de un método de medición o para asignar valores a otros materiales. (Guía EURACHEM)

**Material de Referencia Certificado (MRC):** Material de referencia acompañado de un certificado, en el cual uno o más valores de sus propiedades están certificados por un procedimiento que establece trazabilidad a una realización exacta de la unidad en la cual se expresan los valores de la propiedad y en el que cada valor certificado se acompaña de una incertidumbre con un nivel declarado de confianza.' (Guía EURACHEM)

**Mensurando:** Magnitud que se desea medir VIM 2.3 (2.6) 3ª Edición

**Métodos no normalizados:** Método que no aparece en la literatura oficial reconocida.

**Precisión:** Es la proximidad de concordancia entre los resultados de pruebas independientes obtenidos bajo condiciones estipuladas. (Guía EURACHEM) Nota: La precisión depende sólo de la distribución de los errores aleatorios y no se relaciona con el valor verdadero o valor especificado. La medida de la precisión generalmente se expresa en términos de imprecisión y se calcula como una desviación estándar de los resultados de la prueba. —Resultados de prueba independientes significa que los resultados fueron obtenidos de tal forma que no son influenciados por cualquier otro resultado previo sobre el mismo o similar objeto de prueba. Las mediciones cuantitativas de la precisión dependen en forma crítica de las condiciones estipuladas. La Repetibilidad y la Reproducibilidad son series particulares de condiciones extremas.

**Precisión intermedia:** La precisión intermedia expresa la variación dentro de un laboratorio en: diferentes días, diferentes analistas, diferente equipo, etc. (Guía EURACHEM).

**Protocolo de Validación:** Descripción de pruebas específicas para demostrar que un proceso da resultados que cumplen con los criterios preestablecidos de manera consistentes (Guía de validación de métodos analíticos, Colegio de Químicos Farmacéuticos Biólogos México, A.C.)

**Prueba de Robustez:** Estudio dentro del laboratorio para evaluar el comportamiento de un proceso analítico cuando se efectúan pequeños cambios en las condiciones ambientales y/o de operación, semejantes a aquéllos que pudieran surgir en los diferentes ambientes de prueba. La prueba de robustez permite obtener información de los efectos de cambios menores de una forma rápida y sistemática (Guía EURACHEM).

**Repetibilidad:** Precisión en condiciones de repetibilidad, es decir, condiciones según las cuales los resultados independientes de una prueba se obtienen con el mismo método, sobre objetos de prueba idénticos, en el mismo laboratorio, por el mismo operador, usando el mismo equipo y dentro de intervalos de tiempo cortos. (Guía EURACHEM).

**Reproducibilidad:** Precisión bajo condiciones de reproducibilidad, es decir, condiciones según las cuales los resultados de prueba se obtienen con el mismo método, sobre objetos de prueba idénticos, en diferentes laboratorios, por diferentes operadores, usando diferentes equipos. (Guía EURACHEM)

Nota: Una definición válida de reproducibilidad requiere que se especifiquen las condiciones de prueba modificadas. La reproducibilidad puede expresarse cuantitativamente en términos de la dispersión de los resultados.

**Revalidación:** La revalidación de un método analítico consiste en repetir de forma total o parcial su validación, ya sea debido a modificaciones en el método, equipos, en la muestra a analizar, etc. para garantizar la obtención de resultados fiables. (Validación de métodos analíticos; A.E.F.I.) 2001.

**Robustez:** 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" (Guía EURACHEM Edición española, 2016).

**Selectividad:** Describe la habilidad de un procedimiento analítico para diferenciar entre varias sustancias en la muestra y es aplicable a métodos en los que dos o más componentes son separados y cuantificados en una matriz compleja.

**Sensibilidad:** El cambio en la respuesta de un instrumento de medición dividido por el correspondiente cambio del estímulo. (Guía EURACHEM).

Nota: El estímulo puede ser por ejemplo, la cantidad del mensurando presente. La sensibilidad puede depender del valor de estímulo. Aunque esta definición se aplica claramente a un instrumento de medición, también puede aplicarse al método analítico como un todo, tomando en cuenta otros factores tales como el efecto de los niveles de concentración.

**Validación:** Confirmación mediante el suministro de evidencia objetiva de que se han cumplido los requisitos para una utilización o aplicación específica prevista. (ISO 9000:2008/3.8.5)

#### **Validación de un Método:**

1. El proceso de establecer las características de desempeño y limitaciones de un método y la identificación de las influencias que pueden modificar esas características y hasta qué punto. ¿Qué analitos puede determinar el método, en qué matrices, en presencia de qué interferencias? ¿En esas condiciones, qué niveles de precisión y de exactitud pueden alcanzarse?
2. El proceso de verificación de que un método es adecuado a su propósito, o sea, para resolver un problema analítico particular. (Guía EURACHEM).

Nota:

La definición 1. Es aplicable cuando un método se desarrolla sin tener en mente ningún problema en particular.

La definición 2. Es aplicable cuando el método se está desarrollando con un propósito específico. En química analítica otro uso comúnmente encontrado del término de validación es en el contexto de instrumentación. La Validación de Instrumentos se usa para describir el proceso de establecer que un instrumento en un momento dado es capaz de desempeñarse de acuerdo a la especificación diseñada. Estos procesos podrán alcanzarse, por ejemplo, mediante calibraciones o verificaciones de desempeño.

**Verificación:** Confirmación mediante la aportación de evidencia objetiva de que se han cumplido los requisitos especificados. (ISO 9000:2008/3.8.4)

**Valor verdadero convencional (de una magnitud):** Valor atribuido a una magnitud particular y aceptado, algunas veces por convención, por tener una incertidumbre apropiada para un propósito dado. (Guía EURACHEM)

Nota:

“Valor Verdadero Convencional” algunas veces es denominado “valor asignado”, “mejor estimado” del valor, “valor convencional” o “valor de referencia”. Frecuentemente, se utiliza un cierto número de resultados de medición de una magnitud para establecer un valor verdadero convencional.

## **6. Establecimiento de las condiciones y alcance de la validación**

### **6.1 Establecimiento de las condiciones.**

El laboratorio responsable del análisis o ensayo debe definir las condiciones y el alcance de la validación de acuerdo a lo definido por esta guía y a su caso en particular.

### **6.2 Clasificación del Método.**

Se diferencian tres casos, en los que la dificultad de la validación aumenta del primero al tercero:

1. Método Normalizado: Se trata de un método de ensayo normalizado, que se aplica exactamente como está descrito en referencias reconocidas internacionalmente. Ejemplos de referencias reconocidas: USP, FEUM, EP, BP, JP, IP, AOAC, Standard Methods, EPA, PAM, CIPAC, ASTM, ASHTO, ISO, Codex Alimentarius, FDA, FAO, CE, USDA, otras referencias serán evaluadas. (Ver anexo 1).
2. Método Normalizado modificado: Se trata de una modificación a un método de ensayo normalizado. Ejemplos: un método de extracción diferente o la aplicación del método en una matriz diferente a la indicada, aplicación del método en rangos distintos trabajo.
3. Método no normalizado: Se trata de un método de ensayo que no se encuentra en referencias reconocidas internacionalmente.

**Tabla 1: Objetivos de la validación según el tipo de procedimiento de ensayos**

Método de ensayo	Objetivo de la validación
Caso 1: Método Normalizado	Comprobación de que el laboratorio domina el ensayo y lo utiliza correctamente.
Caso 2: Método normalizado modificado	Comprobación de que la modificación introducida en el método original no afecta la capacidad del laboratorio para proporcionar resultados confiables. Ejemplos: Cambio del método de extracción, otra matriz, cambios en el pH.
Caso 3: Método no normalizado	Comprobación de que el método cumple con las características necesarias para dar resultados confiables para el fin propuesto.

### 6.3 Parámetros de Validación.

Los parámetros a evaluar durante una validación de acuerdo al tipo de método, serán los siguientes:

**Tabla 2: Parámetros a Validar para métodos Normalizados.**

Parámetros	MÉTODOS NORMALIZADOS		
	Cualitativo.	Cuantificación de componentes	Propiedad Física
Selectividad / Especificidad	No	No	No
Linealidad	No	Si	+
Exactitud	No	Si	+
Precisión	No	Si	Si
Límite de Detección	SI	+	No
Límite de Cuantificación	No	Si	No
Robustez	No	No	No
Incertidumbre	No	Si	Si

+: Puede o no requerirse, dependiendo de la naturaleza del análisis o rango a validar.

Nota: El laboratorio podrá evaluar únicamente los parámetros de desempeño descritos en la referencia oficial del método siempre y cuando se encuentren disponibles.

**Tabla 3: Parámetros a Validar para métodos Normalizados Modificados.**

Parámetros	Cualitativo.	Cuantificación de componentes	Propiedad Física
Selectividad / Especificidad	<b>Si</b>	<b>+</b>	<b>No</b>
Linealidad	<b>No</b>	<b>Si</b>	<b>+</b>
Exactitud	<b>No</b>	<b>Si</b>	<b>+</b>
Precisión	<b>No</b>	<b>Si</b>	<b>Si</b>
Límite de Detección	<b>SI</b>	<b>+</b>	<b>No</b>
Límite de Cuantificación	<b>No</b>	<b>Si</b>	<b>+</b>
Robustez	<b>No</b>	<b>+</b>	<b>No</b>
Incertidumbre	<b>No</b>	<b>Si</b>	<b>Si</b>

+ : Puede o no requerirse, dependiendo de la naturaleza del análisis o rango a validar.

Nota: si la referencia indica los parámetros de desempeño a evaluar cuando se realicen modificaciones a los métodos, el laboratorio podrá evaluar al menos estos parámetros.

**Tabla 4. Parámetros a Validar en Métodos no Normalizados.**

Parámetros	Cualitativo	Cuantificación de componentes	Propiedad física
Selectividad/ Especificidad	<b>Sí</b>	<b>Sí</b>	<b>No</b>
Linealidad	<b>No</b>	<b>Sí</b>	<b>Si</b>
Exactitud	<b>No</b>	<b>Sí</b>	<b>Si</b>
Precisión	<b>No</b>	<b>Sí</b>	<b>Sí</b>
Límite de Detección	<b>Sí</b>	<b>+</b>	<b>+</b>
Límite de Cuantificación	<b>No</b>	<b>Si</b>	<b>Si</b>
Robustez	<b>Si</b>	<b>Si</b>	<b>Si</b>
Incertidumbre	<b>No</b>	<b>Si</b>	<b>Si</b>

+ Dependerá de la naturaleza del método, de la matriz a ensayar o rango a validar.

## **7. Procedimiento**

### **7.1 Pasos para la validación.**

Cada validación de un procedimiento consiste en tres pasos:

- 7.1.1 Establecimiento del protocolo de validación,
- 7.1.2 Realización de la validación,
- 7.1.3 Elaboración del informe.

### **7.1.1 Establecer un protocolo de validación.**

El protocolo deber ser fechado y firmado por los responsables de la validación o persona designada por el laboratorio y debe incluir como mínimo lo siguiente:

**A. IDENTIFICACION.**

Se deberá de identificar de acuerdo al control interno de documentos definido por el laboratorio.

**B. OBJETIVO.**

Definir la finalidad del protocolo de validación. (Ej. Definir los parámetros a validar, las actividades necesarias para la realización de la validación del método XXX-YY-ZZ para la evaluación del analito EE por la técnica CFG)

**C. ALCANCE.**

Delimitación de tipo de muestra, matriz, analito, rango de concentración, técnica analítica.

Nota: Para muestras de alimento se deberá de utilizar la clasificación establecida en el RTCA 67.04.54:10 Alimentos y bebidas procesadas. Aditivos alimentarios, para la definición de Matriz y número de muestras a validar según lo detallado en el apartado 7 "Sistema de Clasificación de los alimentos" de dicho reglamento, se dará por válido el alcance de la validación de acuerdo a lo siguiente:

1- Categoría de alimento:

Al demostrar la Aptitud del método a través de la validación de al menos el 50% del total de sub categorías y de cada una de ellas 2 tipos de alimentos. (Si la subcategoría lo permite).

Ejemplo:

Para dar por aceptada la categoría de alimento 02.0 Grasas y aceites y emulsiones grasas, se deberá de realizar la validación de al menos el 50% de las sub categorías que para el ejemplo siguiente correspondería a 2 subcategorías. Si elegimos la subcategoría 02.1 y 02.2 tendremos que realizar a validación de al menos 2 tipos de alimentos de cada una., se podría seleccionar la validación de: Aceite de mantequilla, Grasas y aceites vegetales, Mantequilla y mantequilla concentrada y Margarina y productos similares. Al realizar éstas 4 validaciones, se daría por válida la categoría 02.0.

## **02.0 Grasas y aceites y emulsiones grasas**

### 02.1 Grasas y aceites prácticamente exentos de agua

02.1.1 Aceite de mantequilla (manteca), leche de grasa anhidra "ghee"

02.1.2 Grasas y aceites vegetales

02.1.3 Manteca de cerdo, sebo, aceite de pescado y otras grasas de origen animal

02.1.4 Mezcla de aceites y/o grasas de origen animal y vegetal.

02.2 Emulsiones grasas, principalmente del tipo agua en aceite

02.2.1 Emulsiones con 80 por ciento de grasa como mínimo

02.2.1.1 Mantequilla y mantequilla concentrada

02.2.1.2 Margarina y productos similares

02.2.1.3 Mezclas de mantequilla y margarina

02.2.2 Emulsiones con menos del 80 por ciento de grasa

02.3 Emulsiones grasas principalmente del tipo agua en aceite incluido los productos a base de emulsiones grasas mezclados y/o aromatizados

02.4 Postres a base de grasas, excluidos los postres lácteos de la categoría de alimentos 01.7

2- Subcategoría de alimento:

Al demostrar la Aptitud del método a través de la validación de al menos 2 tipos de alimentos (si la subcategoría lo permite).

3- Un alimento en específico. Al demostrar la Aptitud del método a través de la validación para ese alimento.

Nota: Para cualquier otro tipo de muestra, el OSA evaluará la aceptación de un grupo o categoría de matriz para establecer un alcance siempre y cuando se validen al menos 2 tipos de muestras para ese grupo o categoría, siempre que sea posible y basado en la normativa o a la bibliografía presentada por el laboratorio.

Para los casos en los que no existen Categorías o Sub categorías, el alcance estará definido por el tipo específico de muestra que se valida.

#### ***D. RESPONSABLES***

Equipo de validación: Definir e identificar con Nombre los analistas que realizan la validación, persona(s) que revisa(n) el informe de validación, persona(s) que autorizan el informe de validación.

#### ***E. PARAMETROS A ESTUDIAR Y LOS CORRESPONDIENTES CRITERIOS DE ACEPTACIÓN***

Establecer los parámetros a validar y su criterio de aceptación de acuerdo al tipo de referencia utilizada.

#### ***F. MUESTRAS (MATRICES).***

Se definirán los tipos de muestra, identificación.

#### ***G. EQUIPOS, REACTIVOS Y MATERIALES DE REFERENCIA INVOLUCRADOS EN LA VALIDACION***

Detallar los equipos involucrados en la validación así como la codificación interna que se ha asignado a cada uno. En cuanto a los reactivos y materiales de referencia utilizados, detallar lote, fecha de vencimiento y proveedor del mismo.

*H. REFERENCIA DEL METODO ANALITICO A VALIDAR*

Detallar el nombre, versión, edición, año y cualquier otra información pertinente de las referencias utilizadas, que permita identificar el método a validar.

*I. PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DE LOS PARAMETROS A EVALUAR*

Detallar claramente los parámetros que se han definido para realizar la validación así como un detalle del procedimiento a seguir para la estimación de cada uno, en el cual incluyan como mínimo detalle de las pesadas a realizar, diluciones, análisis estadístico a aplicar y detalle del proceso a seguir para su determinación y los criterios de aceptación.

**7.1.2 Realización de la validación.**

Una vez se ha aprobado el protocolo se procede a hacer la validación de acuerdo a lo planificado.

Aquí se incluye el proceso de cálculo estadístico de los distintos parámetros evaluados.

Se detalla a continuación, los parámetros estadísticos que pueden realizarse en una validación.

El laboratorio deberá demostrar la validación correspondiente de su alcance según lo detallado en el numeral 7.1.1 c) Alcance de ésta Guía.

**a) Selectividad / Especificidad.**

Procedimiento de determinación de la selectividad.

En el estudio de la selectividad, como norma general se comparan los resultados del análisis de muestras con y sin analito en presencia o ausencia de impurezas, productos de degradación, sustancias relacionadas, excipientes (matriz o placebo), y dependiendo del tipo de muestra, tipo de técnica analítica, instrumento de medición. Partiendo de la experiencia en el análisis de la muestra, se deben establecer las posibles sustancias y/o elementos y adicionar cantidades conocidas de éstas, solas o combinadas a la muestra y evaluar su respuesta al método, bajo las mismas condiciones de análisis.

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 la 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. Se detallan a continuación ejemplos de la determinación de la selectividad:

**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 preparo 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.

Si bien IUPAC recomienda el termino “selectividad”, algunas areas, p. ej. el sector farmacéutico, utiliza “especificidad” o “especificidad analítica”. Este ultimo termino es recomendado para evitar confusion con “especificidad diagnostica”, tal cual se utiliza en medicina de laboratorio. (Guía EURACHEM edición española 2016)

En el caso de métodos no selectivos, como por ejemplo los métodos que utilizan sistemas de medición volumétricas, gravimétricos, entre otros; la especificidad para los componentes de una muestra, es sustentada con los resultados de exactitud y linealidad del método cumplidos los criterios de aceptación.

Se definen a continuación los elementos a considerar para la realización del parámetro de Selectividad.

Muestra	Repeticiones	Calcular/determinar	Comentarios
Muestras de ensayo y material de referencia por e método seleccionado y otros métodos independiente	1 repetición	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.	Se deberá de documentar información complementaria que permita definir mejor la selectividad del analito de interés.

### **Criterios de aceptación**

La respuesta del método debe ser únicamente debida al analito. Cualquier desviación encontrada no deberá ser mayor a los criterios de aceptación establecidos por el laboratorio con respecto a la referencia normativa.

Nota: Si la referencia del método establece la forma de evaluación de éste parámetro de desempeño y sus criterios de aceptación, el laboratorio deberá de cumplir lo indicado en dicha referencia.

### **b) Linealidad**

La linealidad se evaluará con la determinación de Intervalo lineal e Intervalo de trabajo.

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.

El intervalo lineal es la capacidad de un método analítico para dar resultados que son directamente proporcionales a la concentración del analito dentro de un intervalo dado.

Se definen a continuación los elementos a considerar para la realización de los parámetros de Intervalo de trabajo e intervalo lineal.

<b>Muestra</b>	<b>Repeticiones</b>	<b>Calcular/determinar</b>	<b>Comentarios</b>
Medir un blanco más Estándar de referencia esparcidos uniformemente en el rango de interés.	Se trabajarán 5 niveles como mínimo por triplicado, distribuidos uniformemente en el rango de interés.	Graficar la respuesta (eje y) en función de la concentración (eje x). Calcular las estadísticas de regresión apropiadas, calcular y graficar los residuales (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.  No se deben de eliminar valores atípicos sin verificarlo antes utilizando otras mediciones a concentraciones cercanas.

			<p>En ciertas circunstancias, para la calibración de instrumentos, puede ser mejor tratar de ajustar una curva no lineal a los datos.</p> <p>En ese caso, se debe incrementar el número de muestras.</p> <p>Por lo general, no se recomienda el uso de funciones superiores a las cuadráticas</p> <p>En los casos en los cuales la curva no presenta un comportamiento lineal, se debe incrementar el número de niveles de concentración a trabajar.</p>
<p>Medir, de acuerdo con el método documentado, un blanco más material de referencia o blancos de muestra adicionados esparcidos uniformemente en el rango de interés.</p>	<p>Se trabajarán 5 niveles como mínimo por triplicado, distribuidos uniformemente en el rango de interés.</p>	<p>Graficar la concentración medida (eje y) en función de la concentración de las muestras de ensayo (eje x). 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</p>	<p>Este paso se requiere para evaluar si el rango propuesto del instrumento y el procedimiento de calibración son aptos para el uso.</p> <p>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.</p>

**Criterios de aceptación Intervalo lineal**

- Comportamiento lineal en la gráfica de concentración vs respuesta analítica.
- Datos aleatorios en el gráfico de residuales.
- El intervalo de confianza del intercepto debe incluir el cero, cuando se incluyan concentraciones bajas en la curva.

**Criterios de aceptación Intervalo de trabajo**

$r \geq 0.98$

El intervalo de confianza de la pendiente debe incluir la unidad

Nota: Si la referencia del método establece la forma de evaluación de éste parámetro de desempeño y sus criterios de aceptación, el laboratorio deberá de cumplir lo indicado en dicha referencia.

### c) Exactitud

La evaluación práctica de la Exactitud (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.

Se dispone de dos técnicas básicas: Verificación con respecto a los valores de referencia de un material caracterizado y comparación con otro método caracterizado.

Para verificar la Exactitud (veracidad) utilizando un material de referencia, se determina la media y la desviación estándar de una serie de réplicas de una prueba y se compara contra el valor caracterizado del material de referencia. El material de referencia ideal sería un material certificado de matriz natural, muy semejante a la muestra de interés. Claramente la disponibilidad de éstos materiales es limitada. Los materiales de referencia para una validación pueden ser:

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

Muestra	Repeticiones	Calcular/determinar	Comentarios
<p>Se puede utilizar como muestra lo siguiente:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Material de referencia certificado.</li> <li>• Blanco adicionado.</li> <li>• Material de referencia.</li> <li>• Matriz adicionada.</li> <li>• Comparación con método oficial.</li> </ul>	<p>Se trabajarán 3 niveles como mínimo:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Bajo</li> <li>- Medio</li> <li>- Alto</li> </ul> <p>Nivel bajo y alto por triplicado.</p> <p>Y nivel medio sextuplicado.</p> <p>En los niveles seleccionados se debe incluir el rango de trabajo del método. (Ver intervalo de trabajo).</p>	<p>Determinar el valor de Sesgo, error relativo porcentual o recuperación</p>	<p>Reportar el intervalo de confianza del porcentaje de recobro</p>

Nota: Se deberá justificar cuando no aplique la realización de 3 niveles. O se pueda hacer de otra manera, siempre y cuando se justifique y documente.

Para el cálculo del parámetro de Exactitud utilizando Material de Referencia, se deberá tomar en cuenta las siguientes formulas

$$b = \bar{X} - X_{ref}$$

$$b(\%) = \frac{\bar{X} - X_{ref}}{X_{ref}} \times 100$$

$$R(\%) = \frac{\bar{X}}{X_{ref}} \times 100$$

En donde:  $\bar{X}$  - Valor medio

$X_{ref}$  = valor de referencia

b= Sesgo

b(%)= Error relativo porcentual

R(%)= Recuperación aparente.

Para el cálculo del parámetro de Exactitud utilizando matriz adicionada, se deberá tomar en cuenta las siguientes formulas

$$R'(\%) = \frac{\bar{X}' - \bar{X}}{X_{adición}} \times 100$$

En donde:  $R'(\%)$  es la recuperación relativa de adiciones a las diferentes concentraciones.

#### **Criterio de aceptación**

- Se debe tomar en cuenta lo establecido en la referencia del método y, caso contrario, se sugieren las tablas del anexo de la referencia AOAC Guideline for single laboratory validation of chemical methods for dietary supplements and botanicals. 2002. (ver anexo 3). Otras referencias podrán ser evaluadas.

#### **d) Precisión.**

La precisión es medida mediante la repetibilidad, reproducibilidad y precisión intermedia.

**REPETIBILIDAD:** Estudia la variabilidad del método efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra en las mismas condiciones operativas (un mismo analista, mismos aparatos y reactivos, etc.) en un mismo laboratorio y en un periodo de tiempo corto.

**PRECISION INTERMEDIA:** Estudia la variabilidad del método efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra, pero en condiciones operativas diferentes (diferentes analistas, aparatos, días, etc.) y en un mismo laboratorio.

REPRODUCIBILIDAD: Estudia la variabilidad del método bajo condiciones operativas diferentes y en distintos laboratorios. Esto aplica en caso de organizaciones con diferentes laboratorios y/o cuando se requiera transferir métodos. Éste parámetro aplica únicamente a laboratorios que tienen cedos con las cuales poder compararse.

Se realizará conforme a lo detallado a continuación:

Muestra	Repeticiones	Calcular /determinar	Comentarios
Se puede utilizar como muestra lo siguiente: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Material de referencia certificado</li> <li>• Blanco adicionado</li> <li>• Material de referencia</li> <li>• Matriz adicionada</li> <li>• Muestra natural con contenido de analito dentro del rango a validar.</li> </ul>	Al menos tres niveles de concentración (Bajo, medio y alto) y realizar al menos 6 repeticiones en cada nivel bajo condiciones de Repetibilidad.  Este parámetro deberá realizarse tomando en cuenta todo el proceso analítico para cada repetición.	Determinar el coeficiente de variación porcentual de los resultados o del porcentaje de recobro obtenido.  Si la referencia tiene otro estadístico de dispersión, justificar su uso.	Determina la Repetibilidad.
	Al menos tres niveles de concentración (Bajo, medio y alto dentro del rango a validar) y realizar al menos 12 repeticiones en cada nivel bajo condiciones de precisión intermedia. 6 repeticiones por cada condición.  Este parámetro deberá realizarse tomando en cuenta todo el proceso analítico para cada repetición.	Determinar el coeficiente de variación porcentual de los resultados o del porcentaje de recobro obtenido y determinar el ANOVA de los datos. Ver anexo 4.  Si la referencia tiene otro estadístico de dispersión, justificar su uso.	Determina la precisión intermedia.
	Las condiciones del estudio de reproducibilidad deberán de ser plantadas por el laboratorio y aprobado por el OSA.	Determinar el coeficiente de variación porcentual de los resultados o del porcentaje de recobro obtenido y determinar el ANOVA de los datos de los laboratorios. Ver anexo 4.	Determina la reproducibilidad

### **Criterio de aceptación**

- Se debe tomar en cuenta lo establecido en la referencia del método. Otras referencias podrán ser evaluadas.

### **e) Límite de Detección y Límite de Cuantificación**

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".

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", 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).

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.

Estos parámetros se relacionan con la cantidad de analito requerida para dar un resultado significativo, cualitativo o cuantitativo.

Según Un resultado "positivo" no es suficiente para que el analista considere detectado un analito. Se precisa además, conocer el límite de detección en las condiciones del método; de lo contrario se puede incurrir en un falso positivo: suponer el analito presente en la muestra cuando de hecho no lo está.

El límite de Cuantificación es un término cuantitativo (menor cantidad medible) mientras que el límite de detección es cualitativo (menor cantidad detectable).

Numéricamente es mayor el límite de Cuantificación y representa la menor cantidad de analito que puede analizarse con un % de Coeficiente de Variación y de Recuperación aceptables. Concentraciones menores pueden detectarse pero no cuantificarse.

Nota: Si el rango validado por el laboratorio es superior al rango lineal de la referencia bibliográfica, se deberá de determinar los parámetros de precisión y exactitud a la concentración más baja del rango validado.

**Determinación de los límites de detección y cuantificación.**

$$LD = \frac{3.3 * sb_o}{m}$$

$$LC = \frac{10 * sb_o}{m}$$

Se realizará conforme a lo detallado a continuación:

Repeticiones	Calcular / determinar	Comentarios
<p>Para métodos cuantitativos:</p> <p>10 blancos de muestras independientes medidos una vez cada uno ó 10 blancos de muestras independientes fortificadas a la menor concentración aceptable medidos una vez cada uno.</p>	<p>Desviación estándar de la muestra s de:</p> <p>a) Valores de blanco de muestra ó</p> <p>b) Valores de los blancos de muestra fortificadas</p>	<p>Expresar límite de detección cómo la concentración del analito correspondiente a :</p> <p>a) El valor promedio de los blancos de muestra + 3s ó</p> <p>b) 0 + 3s</p> <p>Expresar límite de cuantificación cómo :</p> <p>Valor promedio de las lecturas de los blancos + 6s ó + 10s.</p> <p>Cualquier otro factor de cobertura utilizado deberá de ser justificado en base a referencia bibliográfica.</p>
<p>Para métodos cualitativos:</p> <p>Blancos de muestra con adición del analito en al menos 3 niveles de concentración.</p> <p>A cada nivel de concentración, será necesario medir no menos de 10 réplicas independientes.</p>	<p>Construir una curva o tabla de respuesta de porcentaje de resultados (positivos o negativos) contra la concentración.</p>	<p>A partir de la curva o tabla construida, determinar mediante inspección, la concentración mínima a la cual la prueba no es confiable.</p>

Nota: Si la referencia del método establece la forma de evaluación de éste parámetro de desempeño y sus criterios de aceptación, el laboratorio deberá de cumplir lo indicado en dicha referencia.

**f) Robustez**

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" (Guía EURACHEM Edición española, 2016).

Un "ensayo de robustez" implica hacer cambios deliberados en el método, e investigar el efecto subsiguiente en el desempeño con lo que 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.

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

Se realizará conforme a lo detallado a continuación:

Muestra	Repeticiones	Calcular /determinar	Comentarios
Identificar las variables que podrían tener un efecto significativo en el desempeño del método. Establecer experimentos (analizando MR o muestras de ensayo) para supervisar el efecto en los resultados de la medida cambiando de forma sistemática las variables.	Evaluado más efectivamente utilizando diseños de experimentos.  Verificar al menos 7 variables o parámetros utilizando un modelo de Youden.	Determinar el efecto de cada cambio de condición en los resultados de la medida. Clasificar las variables según el mayor efecto sobre el desempeño del método.  Realizar pruebas de significación para determinar si los efectos observados son estadísticamente significativos.	Diseñar el control de calidad o modificar el método para controlar las variables críticas, por ejemplo, indicando los límites de tolerancia adecuados en el método de análisis.

Para determinar la combinación de variables a estudiar, utilizar el modelo de Youden.

Número de corrida	Combinación de factores						
1	A	B	C	D	E	F	G
2	A	B	c	D	e	f	g
3	A	b	c	d	E	f	g
4	A	b	c	d	e	F	G
5	a	B	C	d	e	F	g
6	a	B	c	d	E	f	G
7	a	b	C	D	e	f	G
8	a	b	c	D	E	F	g

Nota: Si la referencia del método establece la forma de evaluación de éste parámetro de desempeño y sus criterios de aceptación, el laboratorio deberá de cumplir lo indicado en dicha referencia.

#### **g) Incertidumbre**

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. 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;
- 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, 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.

Se realizará conforme a lo detallado a continuación:

Muestra	Repeticiones	Calcular /determinar	Comentarios
No Aplica	Utilizar la información obtenida en el proceso de confirmación o validación interna	a) Especificar el mensurando b) Identificar las fuentes de incertidumbre c) Cuantificar los componentes de la incertidumbre (u) d) Calcular la incertidumbre estándar combinada ( $u_c$ ) e) Calcular la incertidumbre expandida ( $u_{exp}$ )	Reportar la incertidumbre expandida con un factor de cobertura $k=2$ y un nivel de significancia del 95%.

### 7.1.3 Elaboración del informe

El **informe de validación** contendrá la información suficiente para poder concluir acerca de la validación que se ha desarrollado.

Debe incluir:

- Hacer referencia al protocolo utilizado
- Parámetros validados y criterios de aceptación
- Resultados Analíticos
- Resultados Estadísticos
- Interpretación de resultados y/o conclusiones
- Cuadro resumen de los resultados obtenidos (parámetro, criterio, resultado y conclusión)
- Declaración de Aptitud del Método
- Datos crudos de la validación

Además será autorizado por o las personas asignadas por el laboratorio.

### 8. Vigencia

Este documento entra en vigencia a partir del 09 de Octubre de 2018.

**FIN DEL PROCEDIMIENTO**

**ANEXO 1: ABREVIATURAS DE REFERENCIAS RECONOCIDAS INTERNACIONALMENTE**

<b>ABREVIATURA</b>	<b>REFERENCIA</b>
USP	Farmacopea de los Estados Unidos
FEUM	Farmacopea Mexicana
EP	Farmacopea Europea
BP	Farmacopea Británica
JP	Farmacopea Japonesa
AOAC	Official Methods of Analysis of AOAC
Standard Methods	Standard Methods
EPA	Environmental Protection Agency
CIPAC	Collaborative International Pesticides Analytical Council
ASTM	American Society for Testing and Materials,
ASHTO	American Association of State Highway and Transportation Officials,
ISO	“International Organization for Standardization”,
Codex alimentarius	Codex alimentarius
FDA	Food and Drug Administration
FAO	Food and Agriculture Organization
USDA	United States Department of Agriculture

**ANEXO 2: Clasificación y criterios de precisión en función de la concentración de analito**

**% de recuperación de analito a distintas concentraciones.**

<b>Analito %</b>	<b>Proporción de Analito</b>	<b>Unidades</b>	<b>CV%</b>
100	1	100%	1.3
10	10-1	10%	2.8
1	10-2	1 %	2.7
0.1	10-3	0.1%	3.7
0.01	10-4	100 ppm	5.3
0.001	10-5	10 ppm	7.3
0.0001	10-6	1 ppm	11
0.00001	10-7	100 ppb	15
0.000001	10-8	10 ppb	21
0.0000001	10-9	1 ppb	30

AOAC Peer-Verified Methods Program, Manual on policies and procedures, Arlington, Va., USA (1998).

**ANEXO 3: Tablas de referencia AOAC**

**Guía para considerar los niveles del Intervalo lineal**

Categoría	Tipo de prueba	Intervalo recomendado
<b>1</b>	Cuantificación de analito	80 % - 120% del valor de la especificación
<b>2</b>	Cuantificación del analito a nivel trazas	0 %- 150% del valor de la especificación

**Criterios de aceptación para Porcentaje de Recobro**

Concentración del Analito	Intervalo
100%	98 % - 101 %
10%	95 % - 102 %
1%	92 % - 105 %
0.1%	90 % - 108 %
0.01 %	85 % - 110 %

Concentración del Analito	Intervalo
$\geq 100 \mu\text{g}/\text{kg}$ ó $\mu\text{g}/\text{L}$ (ppb)	80 % - 110 %
$\geq 10 < 100 \mu\text{g}/\text{kg}$ ó $\mu\text{g}/\text{L}$ (ppb)	70 % - 110 %
$\geq 1 < 10 \mu\text{g}/\text{kg}$ ó $\mu\text{g}/\text{L}$ (ppb)	60 % - 120 %
$\leq 1 \mu\text{g}/\text{kg}$ ó $\mu\text{g}/\text{L}$ (ppb)	50 % - 120 %

**ANEXO 4. Análisis de la varianza (ANOVA).**

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.).

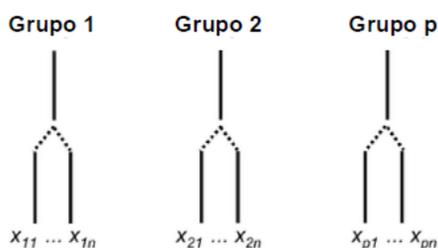


Figura 1. Ejemplo de un “diseño anidado” correspondiente a un experimento en el que se pueden evaluar distintas medidas de precisión utilizando ANOVA.

En la Figura 1 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 v 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)	$\nu$	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 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 2 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:

$$s_r = \sqrt{MS_i}$$

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

$$s_l = \sqrt{\frac{MS_e - MS_i}{n}}$$

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

$$s_I = \sqrt{s_r^2 + s_l^2}$$

Se explica un experimento: 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 usara el método de manera rutinaria.

Tabla 1 – 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

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

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, periodo amplio de tiempo (precisión intermedia). Observar que con este enfoque, no es posible alcanzar conclusiones sobre

que 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 1 conducirá a una tabla de resultados similar a la de la Figura 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 ( $v$ ) será  $N-p = 16-8 = 8$  para  $s_r$ . El valor de  $v$  para la precisión intermedia es más complejo pero no será inferior a  $p-1$ , p. ej. 7 en este ejemplo (véase la Figura 2). Esto lleva a un compromiso razonable entre la carga de trabajo y la incertidumbre en el cálculo de la precisión.