



**CENTRO NACIONAL DE REFERENCIA
DE PLAGUICIDAS Y CONTAMINANTES**

GÚIA DE VALIDACIÓN DE MÉTODOS PARA EL ANÁLISIS DE PLAGUICIDAS

Directorio

Dr. Francisco Javier Trujillo Arriaga
Director en Jefe del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria

QFB. Amada Velez Méndez
Directora General de Inocuidad Agroalimentaria, Acuícola y Pesquera

QA. Mayrén Cristina Zamora Nava
Directora del Centro Nacional de Referencia de Plaguicidas y Contaminantes

QA. Jocelyn Grethel Cedillo Saldaña
Encargada de la Subdirectora de Análisis de Plaguicidas y Contaminantes

HB. Sofia Heredia Cuevas
Jefe del Departamento de Calidad

Comité Editor

QFB Juan José Hernández Soto
Responsable del Departamento de Validación de Métodos

QA Vania Gabriela Martínez Paredes
Analista del Departamento de Validación de Métodos

IIA Alejandro Molina Silverio
Analista del Departamento de Validación de Métodos

IA Oscar Emmanuel Novelo Rivas
Analista del Departamento de Validación de Métodos

CONTENIDO

1	Propósito.....	4
2	Alcance	4
3	Referencias.....	4
4	Desarrollo	4
4.1	Clasificación del método	4
4.2	Selección de parámetros de validación.	5
4.3	Pruebas preliminares.....	7
4.4	Confirmación de identidad	7
4.4.1	Selectividad.....	7
4.4.2	Especificidad	7
4.7	Exactitud, Precisión y Recuperación.....	8
4.7.1	Exactitud	8
4.7.2	Precisión	9
4.7.3	Recuperación	9
4.8	Intervalo lineal y de trabajo	9
4.8.1	Intervalo lineal	9
4.8.2	Intervalo de trabajo.....	9
4.9	Límite de detección	9
4.10	Límite de cuantificación	10
4.11	Robustez	10
4.12	Estimación de incertidumbre	11
4.12.1	Mensurando	12
4.12.2	Modelo físico.....	12
4.12.3	Magnitudes de entrada	13
4.12.4	Fuentes de incertidumbre	13
4.12.5	Modelo matemático.....	13
4.12.6	Contribución de fuentes de incertidumbre.....	14
4.12.7	Incertidumbre de la curva de calibración por mínimos cuadrados	15
4.12.8	Incertidumbre típica combinada	15
4.12.9	Incertidumbre expandida.....	15
4.12.10	Expresión de la incertidumbre.....	16
4.13	Criterios de aceptación	16

1 Propósito

La presente guía describe el proceso y criterios para la validación de métodos analíticos, dirigido hacia laboratorios que coadyuvan con el SENASICA.

2 Alcance

Esta guía establece los lineamientos para la validación de métodos cromatográficos aplicables a metodologías para la detección, confirmación y cuantificación de residuos de plaguicidas en productos agrícolas por cromatografía de líquidos y gases acoplado a espectrómetro de masas/masas.

3 Referencias

- [1] Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed, SANTE/11945/2017.
- [2] Anteproyecto de Directrices sobre Criterios de rendimiento para métodos de análisis para determinación de residuos de plaguicidas, Comisión de CODEX Alimentarius, CX/PR 14/46/10, Marzo de 2014.
- [3] NMX-CH-140-IMNC-2002, Guía para la expresión de incertidumbre en las mediciones.
- [4] La Adecuación al Uso de los Métodos Analíticos, Una Guía de Laboratorio para Validación de Métodos y Temas Relacionados, 1ra Edición Española, Eurachem, 2014.
- [5] Guía CG 4 EURACHEM / CITAC Cuantificación de la Incertidumbre en Medidas Analíticas Tercera Edición Inglesa Primera Edición Española QUAM: 2012.P1-ES

4 Desarrollo

La validación de métodos analíticos se realiza de acuerdo con las necesidades del laboratorio, que directamente está relacionada con los requisitos de sus clientes.

El objetivo principal de un método analítico cuantitativo se enfoca en cuatro puntos importantes:

1. Analito de interés
2. Tipo de matriz
3. Niveles de detección requeridas
4. Niveles de cuantificación requeridas

Por lo que es importante la revisión bibliográfica de normas, artículos y/o notas de aplicación de las diferentes metodologías en existencia, así como el realizar un análisis de insumos con los que cuenta el laboratorio y lo que serán requeridos. Una vez seleccionada la metodología más adecuada a la necesidad del laboratorio es necesario clasificarla.

4.1 Clasificación del método

Un método analítico se puede dividir en base al tipo de publicación que puede ser normalizado o no normalizado, así como también se puede clasificar en base al resultado obtenido, cualitativo o cuantitativo. En seguida se describe cada una de estas clasificaciones.

- a) Método Normalizado: Se consideran métodos o procedimientos normalizados, a aquellos publicados en normas oficiales mexicanas, normas mexicanas o los emitidos por organizaciones de normalización extranjeras, regionales e internacionales, tales como ISO, EN, ASTM, AOAC, EPA, USP, Estandar Methods, etc.
- b) Método no Normalizado: Se consideran métodos no normalizados a aquellos propios o desarrollados por el laboratorio, los métodos obtenidos de publicaciones científicas, así como los métodos normalizados modificados, o ampliados, o usados fuera del alcance propuesto.
- c) Métodos Cualitativos: Se consideran métodos cualitativos a aquellos métodos de análisis cuya respuesta es la presencia o ausencia del analito de forma directa o indirecta en una muestra.
- d) Métodos Cuantitativos: Se consideran método o procedimientos cuantitativos a aquellos métodos de análisis cuya respuesta es la cantidad del analito medido de forma directa (enumeración de masa o volumen) o indirecta (color, absorbancia, impedancia, etc.) en una cierta cantidad de muestra.

4.2 Selección de parámetros de validación.

Para métodos o procedimientos normalizados, el laboratorio debe realizar y presentar evidencia objetiva de la confirmación del método, para demostrar que cumpla con las especificaciones y la competencia técnica para realizarlo adecuadamente, considerando sus propias instalaciones, equipo y personal.

Para métodos o procedimientos no normalizados el laboratorio debe realizar y presentar evidencia objetiva de la validación del método.

En la Tabla 1, se muestran los parámetros a cumplir de acuerdo con la clasificación del método.

Tabla 1. Parámetros de validación y confirmación

Parámetros de desempeño	Método no normalizado		Método Normalizado	
	Cualitativos	Cuantitativos	Cualitativos	Cuantitativos
Exactitud/Sesgo		X		X
Recuperación		X		X
Linealidad		X		X
Intervalo lineal y de trabajo		X		X
Precisión (repetibilidad y reproducibilidad)	X	X		X
Selectividad		X		
Eficiencia (relativa)	X		X	
Límite de detección	X	X		X
Límite de cuantificación		X		X
Especificidad (Relativa)	X	X	X	
Robustez	X	X		
Sensibilidad (Relativa)	X	X	X	
Incertidumbre		X		X
Porcentaje de recobro		X		X

Se debe considerar validar un método analítico, cuando existan los siguientes casos:

- a) Antes de introducir el método analítico en rutina.
- b) Un método establecido es usado en un laboratorio diferente o con diferentes analistas o instrumentos.
- c) Cuando cambia alguna de sus condiciones, por ejemplo: cambio en la técnica de extracción.
- d) Se desarrolla un nuevo método para un problema particular de analito.
- e) Incorporación o ampliación de mejoras de un método ya establecido, por ejemplo, cambio de matriz.
- f) Se debe demostrar la equivalencia entre dos métodos.

Para la validación de cada metodología analítica en específico, se debe considerar los puntos del diagrama 1.

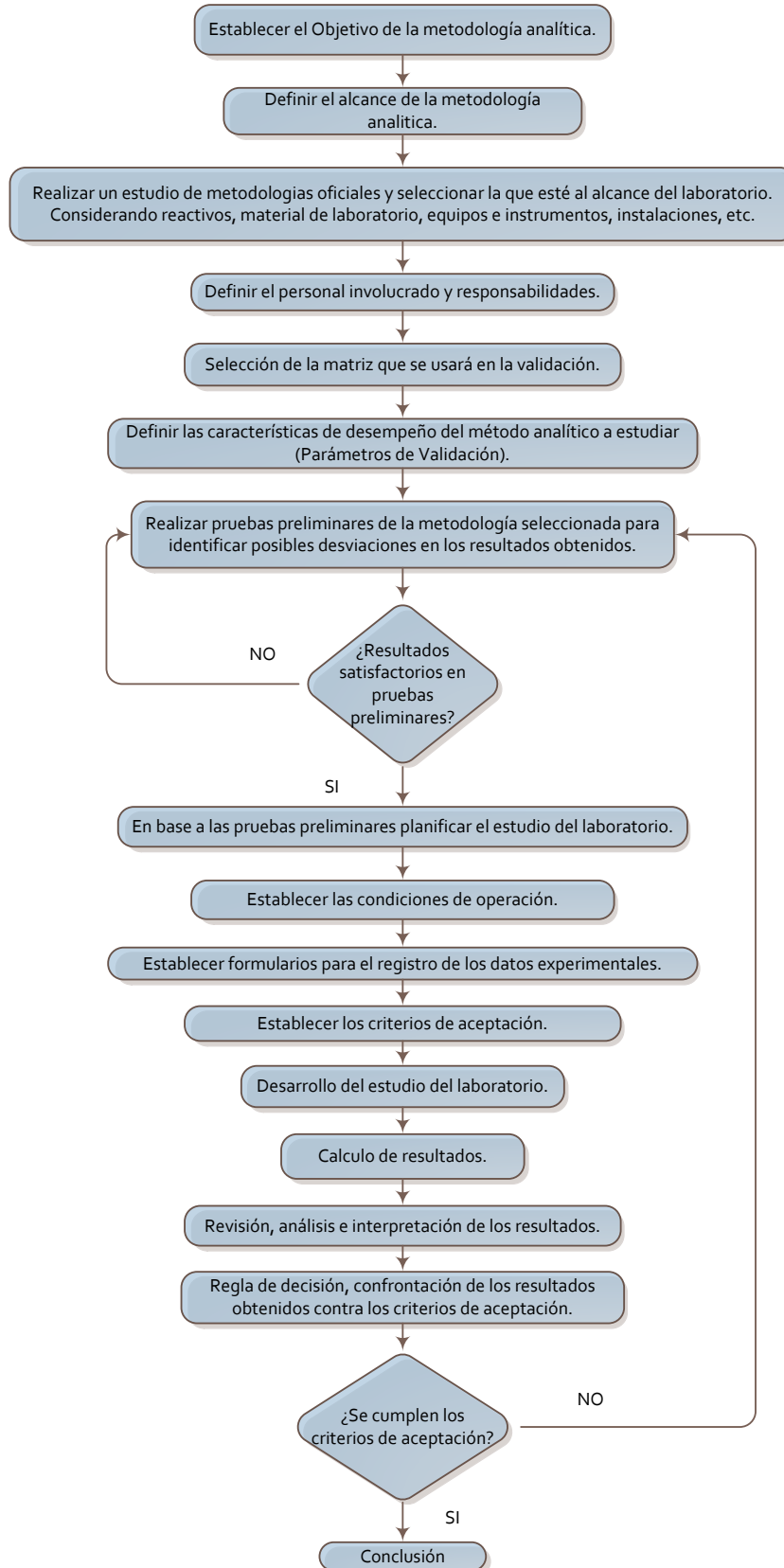


Diagrama 1. Desarrollo de una validación

4.3 Pruebas preliminares.

Las pruebas preliminares se definen como la etapa preoperatoria de la validación, por lo que se deben resguardar los registros, se pueden considerar como pruebas los siguientes puntos:

- Planeación de la metodología
- Búsqueda bibliográfica de las transiciones de referencia de los analitos de interés
- Adquisición del material de referencia
- Pruebas del método analítico
- Confirmación de la identidad
- Interferencias del blanco de matriz
- Límite de detección candidato
- Límite de cuantificación candidato
- Concentraciones de saturación
- Transiciones óptimas como cuantificadores

Una vez que se llevan a cabo las pruebas preliminares, se deben de incluir en el desarrollo del estudio de laboratorio los siguientes parámetros de validación:

- Confirmación de identidad
- Repetibilidad
- Reproducibilidad
- Exactitud, precisión y recuperación
- Intervalo lineal y de trabajo
- Límite de detección
- Límite de cuantificación
- Robustez
- Incertidumbre

4.4 Confirmación de identidad

La conformación de identidad es establecer que la señal producida en la medición se atribuye al analito solamente y no a la presencia de algo física o químicamente similar. Este parámetro es la combinación de dos parámetros de validación Selectividad y Especificidad.

4.4.1 Selectividad

La selectividad es la aptitud de un método para cualificar el analito de interés en presencia de otros componentes de comportamiento análogo bajo las condiciones establecidas del ensayo.

La prueba de selectividad debe realizarse de acuerdo al método que requiera el laboratorio, en el caso de un espectro de masas/masas, la información de las transiciones obtenidas es comparada en presencia de una interferencia, es decir; se deben evaluar distintos blancos de matriz de interés y blancos de matriz fortificados con el analito, los cuales se deben analizar bajo el mismo método cromatográfico y determinar si existe alguna interferencia en el tiempo de retención del analito de interés, si es posible se seleccionan otras transiciones del analito para poder eliminar dichas interferencias, sino se debe tener presente en la confirmación de identidad del compuesto.

4.4.2 Especificidad

La especificidad es la aptitud de un método para responder exclusivamente al analito que se desea analizar, va referenciado al análisis de compuestos similares dentro de un grupo, por ejemplo: la habilidad para poder diferenciar isómeros de algún compuesto bajo las condiciones establecidas del ensayo.

Una vez, que se tienen las condiciones adecuadas del método cromatográfico con el analito de interés (Especificidad), se realiza el análisis de distintos blancos de matriz para poder ver posibles interferencias debidas a la variedad de matriz o la madurez de esta (Selectividad). Los criterios de aceptación para la confirmación de la identidad es seleccionar 1 transición de cuantificación, 1 transición de confirmación, conocer el tiempo de retención del analito y la relación de iones que dependerá de la matriz analizada en una misma secuencia.

4.5 Repetibilidad

Cuando se realiza una medición de una magnitud intervienen factores como pueden ser el método y forma de ejecutar la medición, los técnicos que realizan la medición, las condiciones ambientales, defectos instrumentales o el paso del tiempo; entre otros. Todos estos factores provocan un cierto grado de desviación en la estimación del valor de la magnitud debido al desconocimiento o falta de control de la influencia de estos en el proceso de medida. La repetición es esencial para obtener estimaciones confiables del método, tomando en cuenta las variaciones en las condiciones de operación que se esperan durante la rutina diaria en la que se lleva a cabo el método.

La repetibilidad es la evaluación de la proximidad entre los resultados obtenidos (precisión) en el método analítico bajo las mismas condiciones de trabajo; es decir, mismo analista, mismo instrumento en una escala de tiempo corta.

La repetibilidad se evalúa con el promedio y la desviación estándar del porcentaje de recobro de un mínimo de 6 repeticiones y un máximo de 15, por cada nivel de fortificación y prueba realizada. La evaluación de la repetibilidad debe de cumplir con los criterios de aceptación al menos en el Límite de cuantificación y un nivel más dentro del intervalo de trabajo de al menos 2 pruebas. Los dos criterios de aceptación para la repetibilidad por cada nivel de fortificación deben ser que el promedio del porcentaje de recobro debe estar entre el intervalo de 70-120% y su coeficiente de variación menor al 20%.

Al cumplirse los criterios de aceptación se concluye que el método es repetible bajo las condiciones del ensayo.

4.6 Reproducibilidad

Cuando se evalúa la precisión bajo condiciones de trabajo diferentes a la prueba de repetibilidad, se obtiene la reproducibilidad; con la cual se determina si existe algún efecto en los resultados de porcentaje de recobro por algún factor mediante un análisis de la varianza para un factor con efectos aleatorios. Los factores que influyen en la evaluación de la reproducibilidad pueden ser diferente analista, diferente instrumento y/o en diferentes periodos de tiempo.

La reproducibilidad se evalúa con el promedio y la desviación estándar del porcentaje de recobro de al menos dos pruebas. Hay que considerar los mismos niveles evaluados y que cumplen el parámetro de repetibilidad. La evaluación de la reproducibilidad debe de cumplir con los criterios de aceptación para el promedio global del porcentaje de recobro, el cual debe estar en el intervalo de 70-120% y el coeficiente de variación global menor al 20%. Se debe realizar la evaluación estadística de los datos de precisión la prueba de significancia F de Fisher para dos réplicas y el Análisis de Varianza (ANOVA) para tres réplicas.

Por lo tanto, al cumplirse los criterios de aceptación se concluye no existe influencia alguna y por lo tanto el método es reproducible.

4.7 Exactitud, Precisión y Recuperación

4.7.1 Exactitud

El manual del *Codex Alimentarius* define la exactitud como el grado de concordancia entre el resultado de un ensayo y el valor de referencia. La exactitud se refiere a una estimación del valor verdadero que determina el grado de coincidencia existente entre el valor medio obtenido de una serie de resultados y un valor de referencia aceptado y se puede determinar por la recuperación de las pruebas de repetibilidad como de reproducibilidad. El estudio del comportamiento de esta estimación está dado por la t de Student para evaluar la tendencia Gaussiana de los datos.

El criterio de aceptación para la exactitud es el parámetro estadístico t de Student que debe cumplir que la $t_{calculada}$ debe estar en el intervalo del valor $\pm t_{(\alpha/2, n-1)}$.

4.7.2 Precisión

La precisión en condiciones de repetibilidad y reproducibilidad estimada sirve para conocer la dispersión de los resultados del método analítico como una desviación típica a diferentes magnitudes dentro del intervalo de trabajo; donde se obtiene el coeficiente de variación del método; que se puede expresar como un intervalo de aceptación de %R mínimo - %R máximo.

4.7.3 Recuperación

El porcentaje de recuperación o porcentaje de recobro (%R) es un parámetro que se basa en la eficiencia del método de extracción para cada Analito de una muestra fortificada intencionalmente, es decir, permite ver el rendimiento del método en cuanto al proceso de extracción y la cantidad de analito existente en la muestra original. Se obtiene a partir de las pruebas de repetibilidad y reproducibilidad, y se utiliza la relación porcentual de la concentración calculada entre la concentración adicionada para su expresión. El porcentaje de recobro es característico para cada plaguicida.

4.8 Intervalo lineal y de trabajo

4.8.1 Intervalo lineal

Se conoce como linealidad a la capacidad de un método de análisis, de mostrar una respuesta del instrumento que sea proporcional a la concentración del material de referencia de estudio. La linealidad del método se determina en al menos 5 niveles de fortificación en matriz de interés. Dichas concentraciones de preferencia deben estar espaciadas uniformemente para su evaluación. Una vez que se grafica la respuesta (eje y) en función de la concentración (eje x), se examina visualmente la curva de calibración para ver si es lineal e identificar si existe alguna meseta de saturación. Enseguida se realiza una regresión lineal, así como análisis de residuales para confirmar la relación lineal de la variable dependiente con la independiente. El intervalo lineal debe considerar el nivel de calibración más bajo, el cual es menor al límite de cuantificación, pero mayor al límite de detección. Los criterios de aceptación para la linealidad en matriz son coeficiente de correlación mayor a 0.98 ($r^2 > 0.98$) y residuales menores al ± 20 %.

4.8.2 Intervalo de trabajo

Es el intervalo entre el nivel más bajo y alto de concentración que ha sido demostrado que puede ser determinado con la precisión y exactitud requeridas para una determinada matriz. Se determina como la concentración mínima cuantificable o límite de cuantificación hasta la concentración máxima fortificada para cada Analito. Se relaciona con la concentración de la muestra procesada por el método y se expresa en mg/Kg para una muestra, por lo que se grafica la concentración medida de la muestra en función de las concentraciones adicionadas. A esta concentración medida se le aplica el factor del proceso de extracción de plaguicidas, es decir la preparación de la muestra.

Se grafica la concentración medida (eje y) en función de la concentración adicionada (eje x), se examina visualmente la curva de calibración para ver si es lineal e identificar si existe alguna meseta de saturación. Enseguida se realiza una regresión lineal, así como análisis de residuales para confirmar la relación lineal de la variable dependiente con la independiente. El intervalo de trabajo debe considerar el límite de cuantificación. Los criterios de aceptación para la linealidad en matriz son coeficiente de correlación mayor a 0.98 ($r^2 > 0.98$) y residuales menores al ± 20 %.

4.9 Límite de detección

El límite de detección (LD) es la concentración mínima del analito en una muestra, que puede ser detectada por un método analítico, pero no necesariamente cuantificada bajo condiciones experimentales establecidas. El desarrollo experimental para determinar el límite de detección se realiza inyectando diez veces el blanco de matriz de interés, así como muestras extraídas a diferentes concentraciones por debajo del límite de cuantificación del analito. Las evaluaciones para considerar una concentración experimental al límite de detección son los siguientes incisos:

- La respuesta del LD debe ser mayor a 3 veces la respuesta del blanco de matriz de interés ($\text{Resp} > 3 * \text{Resp blanco}$)
- El coeficiente de variación (CV) de las respuestas por triplicado del LD debe ser menor al coeficiente de variación proveniente del sistema de inyección del instrumento. Esta información del CV puede ser obtenida experimentalmente o proporcionada por el proveedor.

- c) La relación de señal ruido del LD debe ser mayor a 3 ($S/N > 3$)
- d) La inspección visual del pico en el LD debe ser cromatográficamente aceptable.
- e) La relación de iones en matriz representativa debe cumplir con un coeficiente de variación de $\pm 30\%$.

Se puede determinar el límite de detección teórico por medio de la cuantificación de blancos de matriz por medio de una curva de calibración del analito; esta determinación sirve como referencia de partida para conocer la concentración candidata del límite de detección. Dicha concentración candidata debe ser comprobada experimentalmente, en caso de que no cumpla con las evaluaciones descritas en el párrafo anterior, se deben probar otras concentraciones menores al límite de cuantificación. El criterio de aceptación para el límite de detección es que debe ser menor al límite de cuantificación.

4.10 Límite de cuantificación

El límite de cuantificación es la concentración mínima de la sustancia de interés que puede ser cuantificada de manera confiable, es decir que sea exacta y precisa. Por lo que el desarrollo experimental para el límite de cuantificación se realiza fortificando la concentración candidata con un mínimo de 6 repeticiones y un máximo de 15 para evaluar su exactitud y precisión. Se evalúa con el promedio y la desviación estándar del porcentaje de recobro o concentraciones medidas de un mínimo de 6 repeticiones y un máximo de 15, en el nivel candidato de LC.

La evaluación del límite de cuantificación debe cumplir con los criterios de aceptación de exactitud en base al análisis estadístico de t de Student y la precisión se evalúa con un coeficiente de variación menor al 20%.

El límite de cuantificación debe ser menor al Límite Máximo de Residuos (LMR) asociado a la matriz de interés, en caso de que no exista un LMR se debe tomar en cuenta la necesidad del cliente o del laboratorio para considerar la concentración tentativa de LC.

4.11 Robustez

La robustez es la medida de la capacidad de un procedimiento analítico para no ser afectado por variaciones pequeñas pero deliberadas en los parámetros del método y que provee una indicación de su fiabilidad durante su uso habitual.

La robustez de un método analítico permite identificar aquellas variables intrínsecas del método de preparación de la muestra, que puedan provocar cambios significativos y que debieran ser controladas más estrictamente. Algunos ejemplos de factores que pueden ser evaluados en la robustez son: temperaturas, velocidades, tiempos y volúmenes de proceso, diferentes marcas de reactivos, diferentes tipos de materiales volumétricos, de filtración, número de lavados, entre otros.

La evaluación de robustez se realiza mediante el método de Youden-Steiner, el cual se basa en un diseño de experimentos para 7 factores con 8 combinaciones para su medición, el cual se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Diseño de experimentos para robustez

Factores	Combinaciones							
	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
E / e	E	e	E	e	e	E	E	E
F / f	F	f	f	F	F	f	f	F
G / g	G	g	g	G	g	G	G	g
Resultados	s	t	u	v	w	x	y	z

Los valores nominales validados en el método se designan con mayúscula mientras que las variaciones correspondientes se designan con minúsculas. Cada prueba se procesa bajo los factores indicados en la tabla y se obtiene el resultado de cada una midiendo el porcentaje de recobro.

A continuación, se analiza cada factor realizando dos promedios de los porcentajes de recobro, en el primero se toma los resultados donde influyen los valores nominales (mayúsculas) y el segundo se toman los resultados donde influyen las variantes (minúsculas). Por ejemplo, para el factor "A" se promedia los porcentajes de recobro s, t, u, v; para el factor "a" se calcula el promedio de los porcentajes de recobro w, x, y, z; para el factor "B" se promedia los porcentajes de recobro s, t, w, x; para el factor "b" se promedian los porcentajes de recobro u, v, y, z.

Estos promedios se restan teniendo una diferencia del promedio de los valores nominales menos las variantes; es decir A-a; B-b; así sucesivamente.

Un método es robusto al factor evaluado cuando la diferencia de los promedios de los valores nominales (mayúsculas) y las variantes (minúsculas) del factor, es menor a dos veces la desviación estándar obtenida en el parámetro de reproducibilidad $S_{Factor} < 2 * S_R$. En caso de que no cumpla este criterio de aceptación entonces se determina que el método no es robusto para ese factor.

4.12 Estimación de incertidumbre

La estimación de incertidumbre se debe realizar de acuerdo con el método definido en la norma NMX-CH-140-IMNC-2002. El criterio de aceptación para la estimación de la incertidumbre es un intervalo del 10 al 40% como aceptable en el límite de cuantificación del analito. En el diagrama No. 2 se indican los pasos que se deben de llevar a cabo para poder estimar la incertidumbre de un proceso de cuantificación.

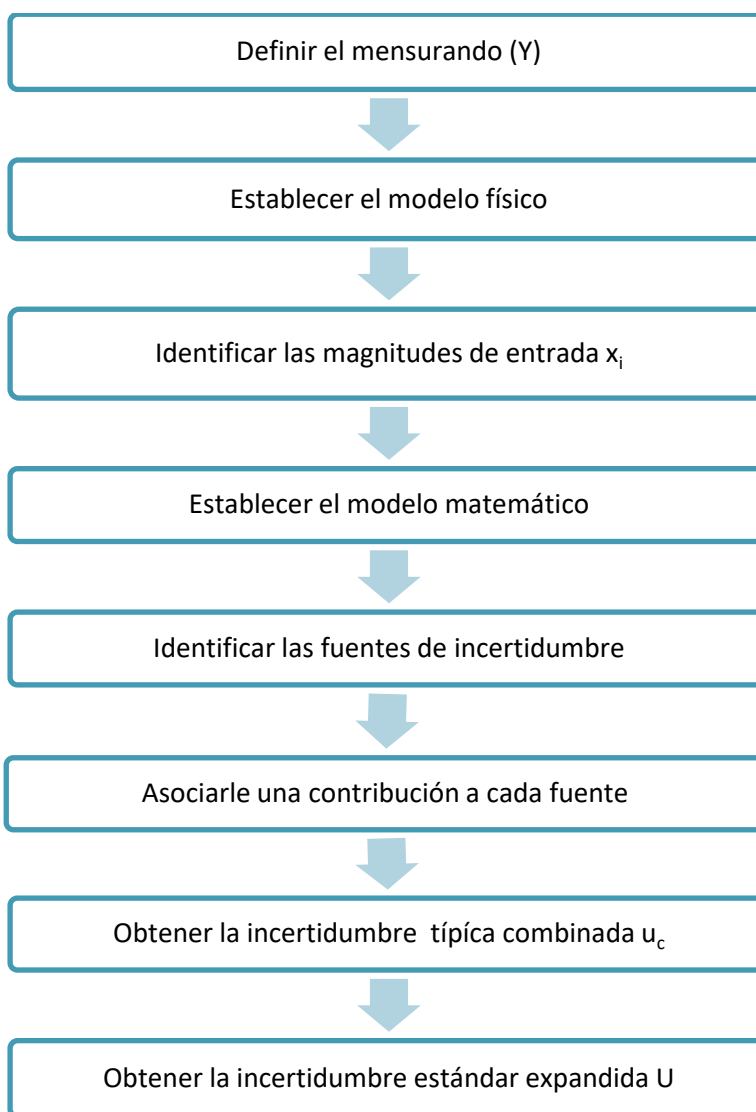


Diagrama 2. Pasos para estimar la Incertidumbre.

4.12.1 Mensurando

En la cuantificación de residuos de plaguicidas en productos vegetales se le llama mensurando a la concentración del analito de interés (C_A) que cuantifica en la muestra y se reporta en el informe de resultados, sus unidades están dadas en mg/Kg.

4.12.2 Modelo físico

Consiste en una representación gráfica sencilla en la que puede verse de manera relacional representando el problema a analizar y sus relaciones múltiples entre las diversas fuentes que intervienen en un proceso, se puede utilizar un diagrama de Ishikawa para su desarrollo. Para el modelo físico, es necesario tener claro el proceso que se realiza durante la cuantificación de los plaguicidas. A continuación, se muestra en el Diagrama 1 un ejemplo del modelo físico.

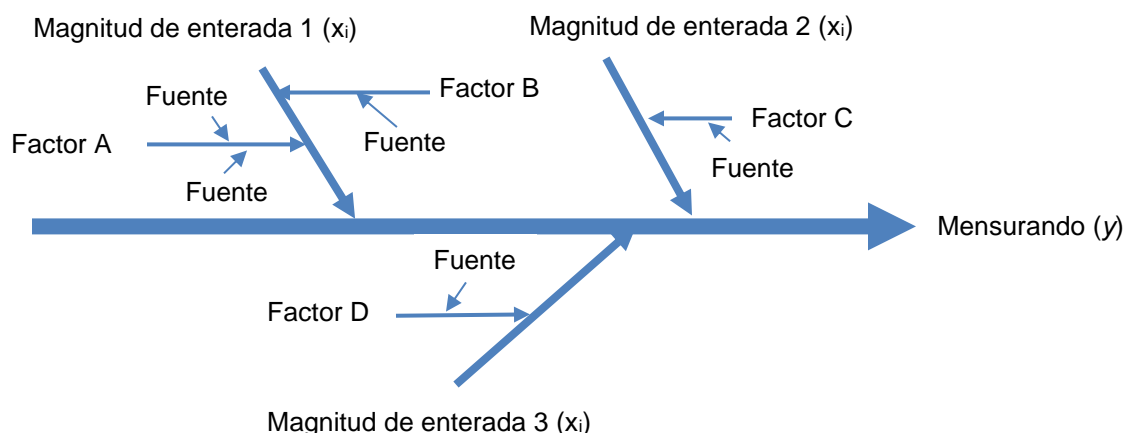


Diagrama 3. Modelo físico del proceso de cuantificación

4.12.3 Magnitudes de entrada

Las magnitudes de entrada (x_i) pueden ser las variables o procesos principales que se pueden medir durante el proceso de extracción y cuantificación de los analitos, con el fin de obtener como resultado final el mensurando, dichas magnitudes deben estar visualizadas en el modelo físico.

4.12.4 Fuentes de incertidumbre

Las fuentes de incertidumbre por cada magnitud de entrada (x_i) provienen de los diversos factores involucrados en la medición, por ejemplo:

- Los resultados de la calibración del instrumento.
- La incertidumbre del patrón o del material de referencia.
- La repetibilidad de las lecturas.
- La reproducibilidad de las mediciones por cambio de observaciones, instrumentos u otros elementos.
- Características del propio instrumento, como resolución, histéresis, deriva, etc.
- Variaciones de las condiciones ambientales.
- La definición del propio mensurando.
- El modelo particular de la medición.
- Variaciones en las magnitudes de influencia.

4.12.5 Modelo matemático

Un modelo matemático es una expresión matemática donde se relacionan las magnitudes de entrada (x_i) con la finalidad de obtener como resultado el mensurando, en el modelo matemático se debe tomar el cual se expresa en las unidades reportadas de la cuantificación del analito en el informe de resultados.

$$\text{Mensurando} = \text{Magnitud de entrada 1} * \text{Magnitud de entrada 2} * \text{Magnitud de entrada 3}$$

De manera general, el cálculo involucrado en la medición de una concentración de masa de cualquier elemento químico está dado por:

$$\gamma X_i = \gamma (x-B) \cdot fd_1 \cdot fd_2$$

Donde:

γX_i = concentración de masa del mensurando obtenida a partir de la aplicación de un método de medición.

$\gamma(x-B)$ = concentración de masa del mensurando obtenida a través de la curva de calibración.

fd1...fd2= factor de dilución aplicado a la muestra; puede haber tantas “n” diluciones como sean necesarias.

NOTA: cuando se emplee un estándar interno en la medición se debe considerar para el cálculo de la concentración del analito.

4.12.6 Contribución de fuentes de incertidumbre

La contribución de cada magnitud de entrada $\mu_i(y)$ está dada por la multiplicación del coeficiente de sensibilidad (c_i) y la **incertidumbre estándar** aportada por sus fuentes de incertidumbre $\mu(x_i)$, esto con el fin de poder obtener la incertidumbre típica combinada del mensurando.

$$\mu_i(y) = c_i * \mu(x_i)$$

Es importante considerar que, antes de combinarlas, todas las contribuciones de las incertidumbres deben estar expresadas como incertidumbres estándar, para lo cual cada una de las magnitudes de entrada se debe clasificar por tipo de evaluación y tipo de distribución para saber cómo se va a manejar la información adquirida, a continuación, se da una explicación de estos conceptos:

- Evaluación Tipo A: La incertidumbre obtenida a partir de “n” observaciones repetidas experimentalmente, la cual se estima con base en la dispersión de los resultados individuales.
- Evaluación Tipo B: Se refiere a la incertidumbre obtenida por información externa o por experiencia; esta información puede ser: certificados de Calibración, manuales del instrumento de medición, especificaciones del instrumento, normas o literatura, valores de medición anteriores, conocimiento sobre las características o el comportamiento del sistema de medición, entre otros. En algunos casos esta información proporciona el factor de cobertura (k).
- Distribución de Probabilidad Normal: Los resultados de una medición repetida afectada por una o más magnitudes de influencia que varían aleatoriamente, generalmente siguen en buena aproximación una distribución normal.
- Distribución de probabilidad Rectangular: En una distribución rectangular cada valor en un intervalo dado tiene la misma probabilidad, o sea la función de densidad de probabilidad es constante en el intervalo.
- Distribución de Probabilidad Triangular: En una distribución triangular, la probabilidad es más alta en el centro del intervalo y se reduce hacia los límites.

Por lo que a partir de los conceptos anteriores podemos estimar la incertidumbre estándar de cada fuente de incertidumbre, la cual se describe en la siguiente tabla:

Tabla 3. Estimación de incertidumbre estándar por tipo y por distribución

Evaluación	Distribución	Fórmula
A	Normal	$\mu = \frac{s}{\sqrt{n}}$
B	Normal	$\mu = \frac{U}{k}$
B	Rectangular	$\mu = \frac{U}{\sqrt{3}}$
B	Triangular	$\mu = \frac{U}{\sqrt{24}}$

Los **coeficientes de sensibilidad** son el impacto de la fuente de incertidumbre sobre el mensurando, por lo que al ser un factor de sensibilidad se debe obtener por las derivadas parciales asociadas al modelo físico correspondiente. Así que por cada magnitud de entrada se obtiene una contribución individual.

4.12.7 Incertidumbre de la curva de calibración por mínimos cuadrados

El método de mínimos cuadrados utilizada supone que las incertidumbres de los valores de las disoluciones de calibración, valores del eje de abscisas, son considerablemente más pequeños que las incertidumbres de sus respuestas, valores del eje de ordenadas, por lo que pueden considerarse despreciables tales incertidumbres. La estimación de la incertidumbre asociada al valor interpolado empleando la función de calibración, involucra la variabilidad de los valores de las respuestas de los niveles de concentración de las referencias empleadas en la calibración, S, el valor de la pendiente, b1, el número de réplicas de la muestra, p, el valor predicho o interpolado de la muestra, xpred, y el número de puntos de la curva de calibración, n. La expresión que permite estimar esta incertidumbre se muestra a continuación:

$$u(c_0) = \frac{S}{B_1} \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(c_0 - \bar{c})^2}{S_{xx}}}$$

Con la desviación estándar residual S expresada por:

$$S_{yy} = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^n [A_j - (B_0 + B_1 \cdot c_j)]^2}{n - 2}}$$

Y:

$$S_{xx} = \sum_{j=1}^n (c_j - \bar{c})^2$$

Expresada de otra forma:

$$u(c_0) = \frac{S_{yy}}{B_1} \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(c_0 - \bar{c})^2}{S_{xx}}}$$

Donde:

B1 pendiente

p número de mediciones para determinar c_0

n número de mediciones para la calibración

c_0 concentración determinada de cadmio de la solución lixiviada

\bar{c} valor medio de los diferentes patrones de calibración (n número de mediciones)

i índice del número de patrones de calibración

j índice del número de mediciones para obtener la curva de calibración

4.12.8 Incertidumbre típica combinada

Una vez que se tienen estimadas las contribuciones de todas las fuentes de incertidumbre, se procede a estimar la incertidumbre típica combinada $\mu_c(y)$, la cual es la raíz cuadrada de todas las sumas de las contribuciones $\mu_i(y)$ obtenidas en el punto anterior.

$$\mu_c(y) = \sqrt{\sum_{i=1}^N \mu_i^2(y)}$$

4.12.9 Incertidumbre expandida

La incertidumbre típica combinada $\mu_c(y)$ representa un intervalo centrado en el mejor estimado del mensurando que contiene el valor verdadero con una probabilidad p de 68% aproximadamente, bajo la suposición de que los posibles valores del mensurando siguen una distribución normal.

Generalmente se desea una probabilidad mayor, lo que se obtiene expandiendo el intervalo de incertidumbre por un factor k , llamado factor de cobertura. El resultado se llama incertidumbre expandida U al multiplicar la incertidumbre típica combinada por el factor de cobertura. En la tabla 4. Se presentan los valores de probabilidad en una distribución normal dependiendo del factor de cobertura utilizado.

$$U = \mu_c(y) * k$$

Tabla 4. Factor de cobertura y probabilidad

Factor de cobertura	Probabilidad
k= 1	68.27%
k= 2	95.45%
k= 3	99.73%

4.12.10 Expresión de la incertidumbre

Al reportar una medida asociada a una incertidumbre debe de llevar los siguientes elementos: el valor corregido de la medida, la incertidumbre expandida, las unidades de medida, el factor de cobertura, la probabilidad asociada y el método utilizado.

$$\text{Valor} = y \pm U; \text{unidades}; k; \% \text{probabilidad}; \text{método}$$

4.13 Criterios de aceptación

Los resultados obtenidos en cada parámetro de validación de cada analito deben ser evaluados bajo los criterios de aceptación individuales.