

---

# *Cálculo de la incertidumbre asociada a los resultados basado en la validación de un procedimiento de análisis.*

## *Aplicación en la determinación de cloruros por HPLC en lixiviados*

Judith Báguena-Polo<sup>a</sup>, Gemma Gotor-Navarra<sup>b</sup>, Francesc Broto-Puig<sup>b</sup>, M<sup>a</sup> Josefa Blanco-Roca<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Gestión de Calidad, Departamento de Química Analítica, Institut Químic de Sarrià, Universitat Ramon Llull

<sup>b</sup> Cromatografía, Departamento de Química Analítica, Institut Químic de Sarrià, Universitat Ramon Llull  
Vía Augusta, 390 - 08017 Barcelona

---

*Calculation of the Uncertainty Associated to the Results Based on Validation of Analysis Procedures.  
Application to Chloride Determination by HPLC in Leachates*

*Càlcul de la incertesa associada als resultats basat en la validació d'un procediment d'anàlisi.  
Aplicació a la determinació de clorurs per HPLC en lixiviats*

*Recibido: 24 de mayo de 2007; revisado: 20 de septiembre de 2007; aceptado: 24 de septiembre de 2007*

### RESUMEN

El presente estudio aplica los datos obtenidos durante la validación de un procedimiento de análisis para el cálculo de la incertidumbre asociada a los resultados que se obtienen con dicho procedimiento. La validación se realiza mediante el estudio de los parámetros de selectividad, linealidad, exactitud, precisión y límite de cuantificación, utilizando muestras adicionadas con patrones. La incertidumbre se calcula a partir de la suma cuadrática de las incertidumbres asociadas al patrón, al sistema instrumental y a la muestra.

**Palabras clave:** Validación de procedimientos. Incertidumbre de resultados.

### SUMMARY

The present study uses the data collected during the validation of an analysis to calculate the associated uncertainty of the results obtained with this procedure. The validation includes the study of the following parameters: selectivity, linearity, accuracy, precision and quantitation limit using spiked samples. The uncertainty is calculated as the quadratic sum of the uncertainties associated to the standard, to the instrumental system and to the sample.

**Key words:** Validation of procedures. Uncertainty of results.

### RESUM

El present estudi aplica les dades obtingudes en la validació d'un procediment d'anàlisi pel càlcul d'incertesa associada als resultats que s'obtenen amb aquest procediment. La validació es realitza mitjançant l'estudi dels paràmetres de selectivitat, linealitat, exactitud, precisió i límit de quantificació, utilitzant mostres adicionades amb patrons. La incertesa es calcula a partir de la suma quadràtica de les incerteses associades al patró, al sistema instrumental i a la mostra.

**Mots clau:** Validació de procediments. Incertesa de resultats.

### 1. INTRODUCCIÓN

La validación de los métodos de ensayo y la estimación de la incertidumbre de la medición forman parte de los requisitos técnicos que han de cumplir los laboratorios acreditados según la norma ISO 17025: 2005<sup>(1)</sup>.

Se llama validación de un método analítico a la obtención de pruebas, convenientemente documentadas, demostrativas de que el procedimiento de estudio es lo suficientemente fiable, como para obtener el resultado previsto, dentro de los intervalos definidos<sup>(2)</sup>. Es decir, el objetivo principal de una validación es demostrar que el procedimiento de estudio es adecuado para el uso propuesto.

La incertidumbre es el parámetro asociado al resultado de una medida que caracteriza la dispersión de los valores que podrían ser razonablemente atribuidos al mesurando<sup>(3)</sup>. Esta variabilidad en los valores de medida puede ser causada por problemas de exactitud o de precisión. Por tanto, la incertidumbre se asocia con el intervalo dentro del cual se encuentra el valor verdadero de la medida, una vez efectuadas las correcciones debidas a errores conocidos.

En el presente artículo se plantea el cálculo de la incertidumbre asociada a un resultado a partir de los datos obtenidos durante la validación de un procedimiento de análisis y su aplicación en la determinación de cloruros por HPLC en lixiviados.

## 2. VALIDACION DE METODOS

Un laboratorio debe validar los métodos no normalizados, los métodos que diseña y desarrolla, los métodos normalizados empleados fuera del alcance previsto, así como las ampliaciones y modificaciones de los métodos normalizados. Se dispone de abundante bibliografía acerca de la validación de métodos analíticos, cosa que demuestra su importancia e interés (Tabla I).

Para diseñar los protocolos de validación es necesario definir los parámetros que se deben estudiar y los criterios de aceptación correspondientes, teniendo en cuenta requisitos técnicos propios del tipo de análisis y otros requisitos relacionados. En general, se consideran los siguientes:

**TABLA I**  
Organismos y guías de validación según sectores.

| Sector          | Organismo  | Guías de validación  |
|-----------------|--|--|
| General         | <b>AENOR</b><br><i>Asociación Española de Normalización y Certificación</i>  | Norma ISO 5725 (Precisión y exactitud) [4]   |
|                 | <b>AOAC</b><br><i>American Association of Official Analytical Methods</i>  | Validation guides [5,6,7]  |
|                 | <b>EURACHEM</b>  | <i>"The Fitness for Purpose of Analytical Methods: A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics"</i> [8]       |
|                 | <b>IUPAC / AOAC/FAO/IAEA</b><br><i>IUPAC: Internacional Union of Pure and Applied Chemistry</i><br><i>IAEA: International Atomic Energy Agency</i> | <i>"Principles and Practices of Method Validation"</i> [9]   |
| Farmacéutico    | <b>ICH</b><br><i>International Conference on Harmonisation</i>   | <i>"Validation of analytical procedures: methodology"</i> Q2 (R1) [10]   |
|                 | <b>AEFI</b><br><i>Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria</i>   | Monografías de AEFI [2]  |
|                 | <b>EP</b><br><i>European Pharmacopoeia</i>   | Monografía<br><i>"General Notices apply to all monographs and other texts"</i> [11]  |
|                 | <b>USP</b><br><i>United States Pharmacopoeia</i>   | Monografía:<br><i>"Validación de procedimientos farmacopeicos"</i> [12]  |
|                 | <b>FDA</b><br><i>Food and Drug Administration</i>  | <i>"Guidance for Industry and Review Guidance. Validation of analytical. Procedures: Methodology"</i> [13, 14]               |
| Medio ambiental | <b>EPA</b><br><i>Environmental Protection Agency</i>   | <i>"Guidance for methods development and methods validation for the RCRA program"</i> [15]                                   |
| Fitosanitarios  | <b>CIPAC</b><br><i>Commission Internationale des Méthodes d'Analyse des Pesticides</i>   | <i>"Guidelines on method validation to be performed in support of analytical methods for agrochemical formulations"</i> [16] |
| Alimentario     | <b>FAO</b><br><i>Food and Agriculture Organization</i>   | <i>"Guidance for Industry. Bioanalytical method validation"</i> [17]   |

tes parámetros: selectividad, linealidad, exactitud, precisión y límite de cuantificación.

### 2.1. Selectividad

Un método es selectivo si es capaz de distinguir y diferenciar la respuesta del analito de estudio, independientemente, de las otras sustancias que forman parte de la matriz, sin interferencias de impurezas, productos de degradación, compuestos relacionados o excipientes presentes en la muestra.

La selectividad es un parámetro decisivo dentro de la validación de un método analítico. Cualquier cambio vinculado con la preparación de la muestra y las condiciones instrumentales supone una reconsideración del estudio de selectividad.

La determinación de la selectividad depende de la técnica analítica aplicada y del tipo de ensayo. En los estudios de selectividad se utilizan ensayos de comparación, donde se tiene en cuenta las respuestas del patrón, el placebo, la muestra o el placebo adicionado, además del blanco de laboratorio. Con los ensayos positivos se asegura que donde se espera respuesta del analito, se encuentra la señal. Mientras que con los ensayos negativos se confirma experimentalmente que donde no debe estar presente el analito, no se obtiene señal de éste.

### 2.2. Linealidad

La linealidad de un proceso analítico, es la capacidad de obtener una respuesta directamente proporcional a la concentración de analito, en un determinado intervalo de concentraciones<sup>(2)</sup>. Los ensayos se pueden efectuar tanto sobre disoluciones patrón como sobre muestras adicionadas. Según el tipo de ensayo y de muestra se debe definir: el intervalo de concentraciones de trabajo, el número de patrones en el margen de estudio y el número de repeticiones por concentración de patrón (Tabla II).

Una vez efectuadas las medidas, para cada patrón se calcula la precisión de los replicados (C.V. %) y se aplica el Test de Cochran para demostrar que se cumple la homogeneidad de varianzas entre niveles de concentración. En caso favorable, se calcula la recta de regresión (respuesta vs concentración) y se comprueba el coeficiente de determinación para asegurar que los datos experimentales se ajustan al modelo lineal escogido (normalmente se acepta  $r^2 > 0,990$ ). Finalmente, para cada concentración se obtiene el valor de la residual (error residual %)<sup>(18)</sup>. Los niveles máximos admitidos para la precisión y el error residual de la recta, los proporcionan los criterios de aceptación establecidos para la precisión y exactitud del procedimiento.

**TABLA II**

Modelos para el estudio de linealidad.

| Tipo de ensayo           | Intervalo concentraciones | Nº de patrones | Replicados de medida |
|--------------------------|---------------------------|----------------|----------------------|
| Riqueza                  | 95-105%                   | 3 - 5          | 3                    |
| Mayoritario              | 80 -120 %                 | 3 - 5          |                      |
| Minoritario <sup>1</sup> | 50 - 120%                 | 5 - 7          |                      |
| Margen amplio            | 50 - 150%                 | 3 - 7          |                      |

<sup>1</sup>Para ensayo límite suele utilizarse el límite de cuantificación como concentración inferior.

### 2.3. Exactitud

La exactitud expresa la proximidad del valor obtenido frente a un valor considerado verdadero<sup>(2)</sup> y aporta información de los errores sistemáticos del procedimiento.

Una de las principales dificultades que se presentan al hacer un estudio de exactitud, es determinar el valor verdadero o de referencia. Para ello, puede utilizarse el valor obtenido a partir de un método ya validado, el valor de un material de referencia certificado o el resultado que se obtiene al aplicar el método de adiciones estándar.

La exactitud se determina en todo el rango especificado para el método analítico. Se recomienda un mínimo de 9 determinaciones sobre tres niveles de concentración.

La exactitud habitualmente se expresa como porcentaje de recuperación. En la Tabla III se presentan criterios de aceptación orientativos según concentración de analito.

**TABLA III**

Criterios de aceptación para el estudio de exactitud.

| % Analito | Unidades | Factor de Recuperación aceptado (%) |            |
|-----------|----------|-------------------------------------|------------|
|           |          | AOAC [6]                            | CIPAC [16] |
| 100       | 100%     | 98.102                              | 98-102     |
| ≥ 10      | 10%      | 98-102                              |            |
| ≥ 1       | 1%       | 97-103                              | 97-103     |
| ≥ 0,1     | 0,1%     | 95-105                              | 95-105     |
| 0,01      | 100 ppm  | 90-107                              |            |
| 0,001     | 10 ppm   | 80-110                              |            |
| 0,0001    | 1 ppm    | 80-110                              |            |
| 0,00001   | 100 ppb  | 80-110                              |            |
| 0,000001  | 10 ppb   | 60-115                              |            |
| 0,0000001 | 1 ppb    | 40-120                              |            |

### 2.4. Precisión

La precisión de un proceso analítico representa el grado de dispersión de una serie de resultados, obtenidos a partir de múltiples repeticiones de una misma muestra homogénea en las condiciones descritas en el método<sup>(2)</sup>.

Según el mayor o menor grado de concordancia entre las distintas fuentes que introducen variabilidad al resultado, se puede distinguir<sup>(4)</sup>:

a) **Repetibilidad:** Es la medida de precisión entre resultados particulares, adquiridos en las mismas condiciones, por un mismo analista, en el mismo laboratorio, con los mismos aparatos y reactivos, y en el curso de la misma serie de análisis efectuados, generalmente, en un intervalo corto de tiempo (*Intra-assay precision*).

b) **Precisión intermedia:** Es la precisión entre resultados particulares de una misma muestra, incluyendo variaciones dentro del mismo laboratorio, es decir, diferentes días, condiciones de operación, analista, equipos (*Intra-laboratory precision*).

El estudio de precisión se suele realizar a tres niveles de concentración y se expresa como el coeficiente de variación (C.V. %) de la serie de medidas. En la Tabla IV se presentan diferentes criterios de aceptación de precisión según concentración de analito.

**TABLA IV**

Criterios de aceptación para el estudio de precisión.

| Analito    | C.V. %<br>KOLTHOFF<br>[9] | C.V. %<br>HORWITZ<br>[5, 2] | C.V. %<br>AOAC<br>[2] |
|------------|---------------------------|-----------------------------|-----------------------|
| 100 %      | 0,1 - 0,3                 | 2                           | 1,3                   |
| 50 %       | 0,3                       | 2,2                         |                       |
| 10 %       | 1                         | 2,8                         | 2,8                   |
| 1 %        | 2 - 5                     | 4                           | 2,7                   |
| 0,1 %      | 5 - 10                    | 5,7                         | 3,7                   |
| 100-10 ppm | 10                        | 10                          | 5,3-7,3               |
| 1 ppm      | -                         | 16                          | 11                    |
| 100 ppb    | -                         | -                           | 15                    |
| 10 ppb     | -                         | -                           | 21                    |
| 1 ppb      | -                         | -                           | 30                    |

### 2.5. Límite de cuantificación

El límite de cuantificación (LC) se define como la mínima cantidad de analito presente en la muestra que se puede cuantificar, bajo las condiciones experimentales descritas, con una adecuada precisión y exactitud.

En procedimientos instrumentales es posible calcularlo de forma teórica a partir de la variabilidad de la señal del blanco, estableciendo como LC la concentración cuya señal corresponde a 10 veces dicha variabilidad<sup>(2)</sup>.

Por otra parte, se puede determinar de forma experimental mediante el análisis de muestras con concentraciones decrecientes de analito, estableciendo el LC como el nivel mínimo en el que se obtienen valores de recuperación y precisión aceptables<sup>(19)</sup>.

### 3. ESTIMACION DE LA INCERTIDUMBRE DE LAS MEDIDAS

El resultado de un ensayo ( $X_{media}$ ) puede no coincidir con el valor verdadero. Además, debido a la imposibilidad conceptual de conocer dicho valor verdadero, se considera el valor de referencia como la mejor aproximación (figura 1). La incertidumbre asociada a un resultado incluye diversos componentes relacionados con las fuentes de error que determinan la precisión y exactitud de la medida. Por ello, el valor estimado de la incertidumbre ( $u$ ) engloba el conjunto de errores sistemáticos (exactitud) y aleatorios (precisión).

Además, el valor obtenido de incertidumbre se multiplica por una constante para obtener la incertidumbre expandida o tolerancia. Habitualmente, se utiliza un factor de 2 para tener un nivel de confianza del 95%. De esta manera, el intervalo  $X_{media} \pm 2u$  incluirá el valor verdadero, con una seguridad del 95%<sup>(18)</sup>.

La incertidumbre se puede calcular con los datos obtenidos durante la validación del procedimiento de análisis, tanto si se utilizan materiales de referencia como muestras adicionadas con patrón.

La expresión de cálculo incluye la suma cuadrática de todas las fuentes de error (ecuación 1).

$$u\% = \sqrt{u^2_{patr\acute{o}n\ \%} + u^2_{sist.\ instrument\ al\ \%} + u^2_{mue\ s\ t\ ra\ \%}} \quad (1)$$

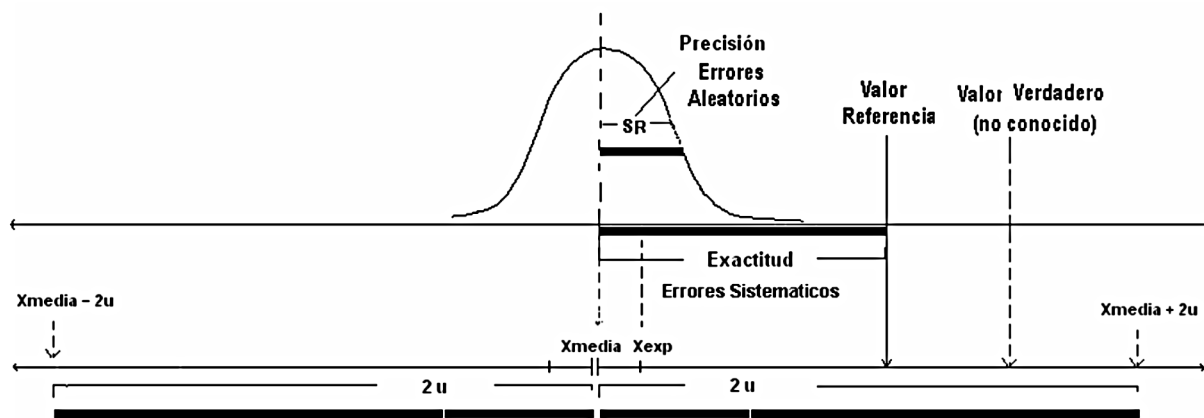


Figura 1. Incertidumbre de las medidas.

$$u_{\text{precisión}} \% = C.V. (\%) / \sqrt{n}$$

$$u_{\text{exactitud}} \% = \frac{|Y_{\text{cal}} - Y_{\text{exp}}|}{Y_{\text{cal}}} \cdot 100$$

*Y exp.: medida experimental*

*Y cal.: valor calculado interpolando el valor de la concentración del patrón en la recta de calibrado.*

La incertidumbre del patrón se calcula a partir de la suma cuadrática de la incertidumbre certificada por el fabricante del patrón o del material de referencia y la incertidumbre correspondiente a su preparación por pesada o dilución.

La incertidumbre del sistema instrumental incluye el conjunto de fuentes de error relacionadas con la resolución, el calibrado y la estabilidad de la medida. Si se considera despreciable la aportación de la resolución, se puede calcular como la suma cuadrática de la incertidumbre asociada a la precisión ( $u_{\text{precisión}}$ ) y a la exactitud ( $u_{\text{exactitud}}$ ) del calibrado, teniendo en cuenta que la estabilidad de la medida queda incluida en el término de precisión.

Para cada patrón de la recta de calibrado, se calcula la  $u_{\text{precisión}}$  a partir del coeficiente de variación de los  $n$  replicados de medida y la  $u_{\text{exactitud}}$  como el valor de la residual (figura 2). Una vez calculada la incertidumbre para cada patrón como la suma cuadrática de los dos términos anteriores, se toma como incertidumbre del sistema instrumental el valor promedio de estas o se asume el valor más desfavorable.

La incertidumbre asociada a la muestra se obtiene tras realizar una serie de análisis replicados del material de referencia o de la muestra y sus correspondientes adiciones. También se calcula como la suma cuadrática de los términos correspondientes a la precisión y la exactitud de los resultados obtenidos. En este caso, la precisión se calcula en condiciones de repetibilidad o precisión intermedia y la exactitud se calcula a partir del sesgo obtenido en la recuperación.

La influencia de la preparación de la muestra queda incluida en el término de la precisión si se realiza de forma independiente para cada ensayo.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSION

### 4.1. Protocolo de validación

En el presente estudio se ha llevado a cabo la validación del procedimiento de análisis para la determinación de aniones cloruro por HPLC-columna de intercambio iónico-detector de conductividad en aguas, residuos líquidos acuosos y lixiviados.

El procedimiento consiste en el análisis por HPLC de una alícuota de la muestra previamente purificada mediante extracción en fase sólida. La cuantificación se realiza por patrón externo, inyectando los patrones de 5, 10, 20 y 50 mg/L. Cuando la muestra presenta una concentración elevada, se realizan las diluciones necesarias. El intervalo de concentraciones de cloruros en las muestras se encuentra comprendido entre 5 mg/L y 10000 mg/L.

El protocolo de validación incluye los parámetros a determinar y los criterios de aceptación correspondientes (Tabla V). Además, se definen las actividades experimentales, cálculos y estadística a realizar.

**Figura 2.** Componentes de la incertidumbre del sistema instrumental.

**TABLA V**  
Criterios de aceptación de la validación.

| Parámetro validación     | Criterio aceptación  |
|--------------------------|--|
| Selectividad             | No se detectan picos interferentes.                            |
| Linealidad               | $R^2 \geq 0,990$<br>C.V. Factor de respuesta $\leq 5 \%$       |
| Exactitud                | Recuperación: 80-120 %   |
| Precisión                | C.V. $\leq 15\%$   |
| Límite de Cuantificación | $\leq 5 \text{ mg/L}$ con un % CV de repetibilidad $\leq 5 \%$ |
| Incertidumbre            | $\leq 20 \%$   |

El responsable de la validación define los criterios de aceptación teniendo en cuenta los valores bibliográficos y las necesidades analíticas según el uso previsto de los resultados obtenidos. Finalmente, deberá realizar a modo de conclusión final una declaración para poner de manifiesto el grado de cumplimiento de los requisitos establecidos.

### 4.2. Selectividad

Comparando los cromatogramas de la disolución del blanco, del patrón, de la muestra y de la muestra adicionada (figuras 3 y 4), se comprueba que el disolvente, el material utilizado y los otros componentes de la muestra no generan picos que interfieran en el análisis de cloruros. A partir de los resultados obtenidos se concluye que el método es selectivo para la determinación de cloruros en muestras de aguas, líquidos acuosos y lixiviados.

### 4.3. Linealidad

La linealidad se ha estudiado analizando por triplicado patrones de cloruro a seis niveles de concentración: 5, 10, 20, 40, 50 y 80 mg/L. Se ha representado la recta de concentración (mg/L cloruro) frente al área promedio correspondiente a cada concentración (figura 5) y se ha obtenido un coeficiente de correlación  $r^2$  de 0,9999, valor que cumple el criterio de aceptación establecido en el protocolo de validación ( $r^2 \geq 0,990$ ).

En la Tabla VI y para cada patrón, se presentan el Área promedio (A), los factores de ( $F_R$ ), la repetibilidad (C.V. %) y el error residual (residual %). El coeficiente de variación de los factores de respuesta obtenidos para el rango de

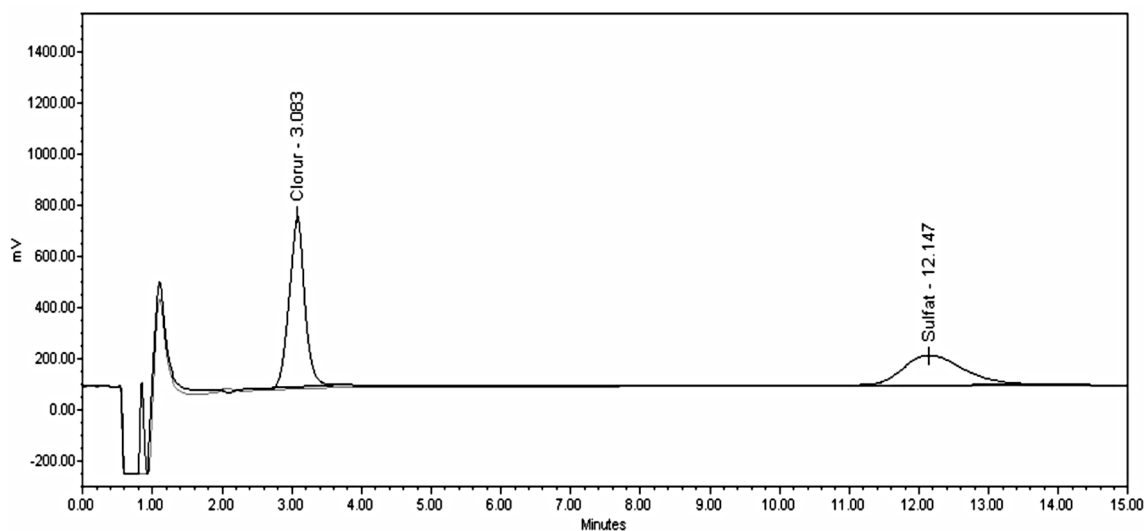


Figura 3. Cromatogramas de blanco (rojo) y de un patrón de cloruros de 20 mg/L (negro).

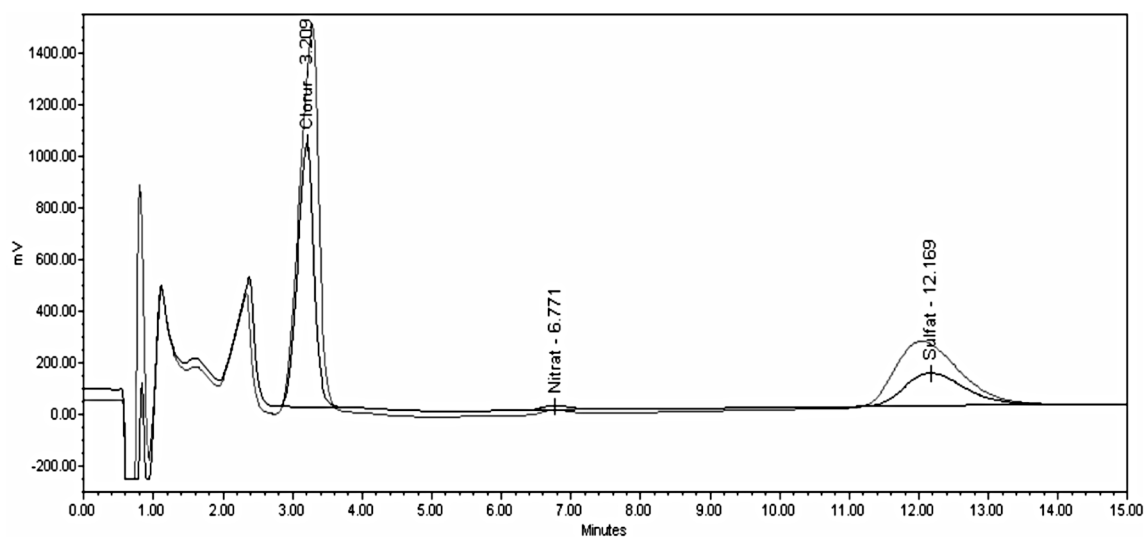


Figura 4. Cromatogramas de la muestra (negro) y muestra adicionada con 25 mg/L de Cloruros (azul).

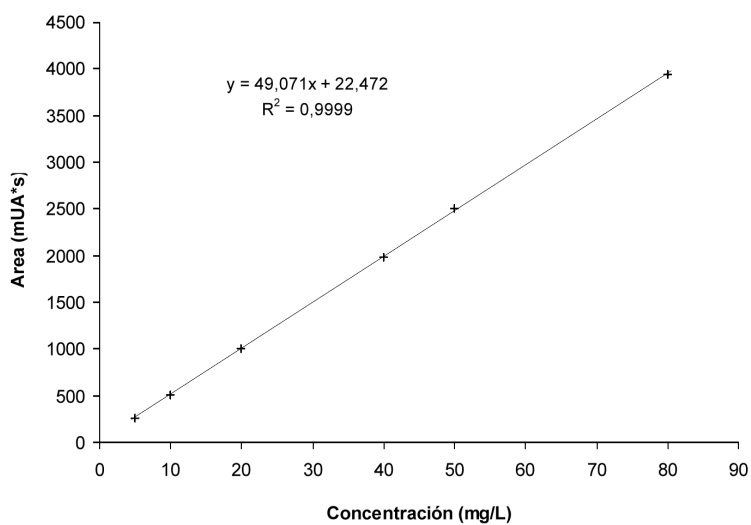


Figura 5. Recta de calibrado de cloruros. Ajustes mínimos cuadrados.

**TABLA VI**  
Estudio linealidad.

| Patrón (mg/L) | Area promedio (mUA*s) | Factor Respuesta $F_r$ (mg/L*mUA*s) | C.V. (%) | Error residual (%) |
|---------------|-----------------------|-------------------------------------|----------|--------------------|
| 5             | 261,00                | 0,01916                             | 0,38     | 2,55               |
| 10            | 509,00                | 0,01965                             | 0,00     | 0,81               |
| 20            | 1007,67               | 0,01985                             | 0,21     | 0,38               |
| 40            | 1983,00               | 0,02017                             | 0,20     | 0,12               |
| 50            | 2498,33               | 0,02001                             | 0,28     | 0,90               |
| 80            | 3935,33               | 0,02033                             | 0,03     | 0,32               |

concentraciones estudiado es de 2,1%, valor inferior al máximo establecido en el protocolo de validación (5%).

#### 4.4. Exactitud y Precisión

Para el estudio de exactitud y precisión se preparan muestras adicionadas a tres niveles de concentración con los que se cubre el alcance del procedimiento: 50, 500 y 6000 mg/L de cloruros.

Para cada nivel de concentración se dispone de nueve determinaciones correspondientes a las tres preparaciones realizadas en tres días distintos (3 niveles x 3 días x 3 preparaciones).

La recuperación se calcula a partir de las 9 determinaciones realizadas para cada nivel de concentración, teniendo en cuenta la concentración presente en la muestra y en la muestra adicionada.

La repetibilidad para cada nivel de concentración se calcula como el promedio de los tres coeficientes de variación correspondientes a los tres resultados de cada día y la precisión intermedia se calcula tomando el conjunto de las 9 determinaciones.

**TABLA VII**  
Estudio de exactitud y precisión.

| Nivel de concentración (mg/L) | Recuperación (%) | C.V. repetibilidad (%) | C.V. precisión intermedia (%) |
|-------------------------------|------------------|------------------------|-------------------------------|
| 50                            | 98,29            | 0,25                   | 0,29                          |
| 500                           | 99,81            | 1,30                   | 1,31                          |
| 6000                          | 99,39            | 1,20                   | 2,28                          |

En la Tabla VII se presentan los resultados promedio obtenidos para cada nivel de concentración, que cumplen los criterios de aceptación establecidos en el protocolo.

#### 4.5. Límite de cuantificación

Considerando que la influencia de la matriz de la muestra no es significativa, se establece como límite de cuantificación la concentración de cloruros correspondiente al patrón bajo del estudio de linealidad. Por tanto, se ha definido como límite de cuantificación el valor de 5 mg/L de concentración de cloruros, para el que se ha obtenido un coeficiente de variación de repetibilidad de las áreas del 0,4%, inferior al 5% establecido como criterio de aceptación.

Por otra parte, el límite de cuantificación calculado a partir de la concentración del patrón que genera una señal igual a 10 veces el ruido sería de 0,1 mg/L de cloruro (figura 6). Con ello, se garantiza que a la concentración de 5 mg/L de cloruros se obtendrán resultados adecuados.

#### 4.6. Incertidumbre

La incertidumbre del patrón ( $u_{\text{patrón}} \%$ ) se calcula a partir de la suma cuadrática de la incertidumbre certificada por el fabricante del patrón y la incertidumbre correspondiente a su preparación por dilución.

El valor de la incertidumbre correspondiente al certificado del fabricante se puede calcular a partir del valor nominal.

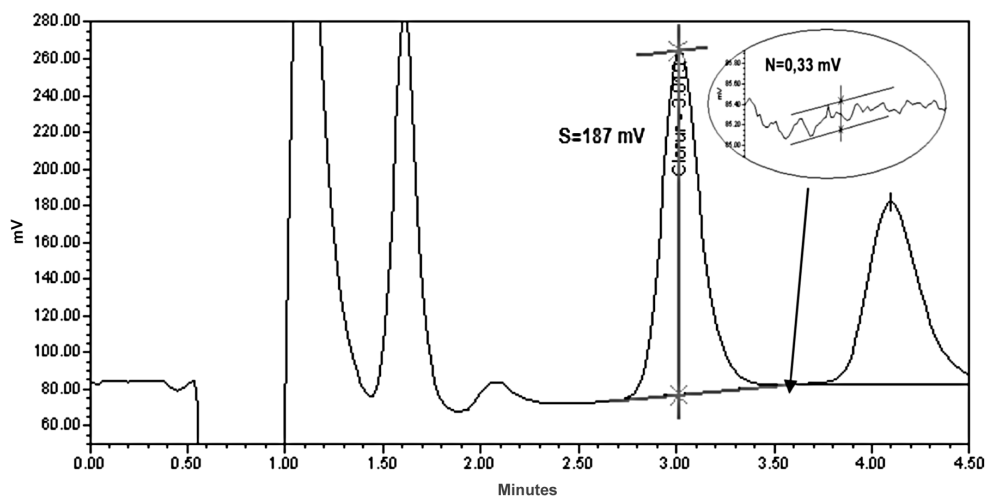


Figura 6. Cálculo de límite de detección con patrón de 5 mg/L de cloruros.

El patrón de cloruros utilizado es de 995-1005 mg/L. Por ello, el error que introduce el patrón (0,5%) se divide por raíz de tres (para convertir la función rectangular en gaussiana), con lo que se obtiene una incertidumbre del 0,29%. El valor de la incertidumbre que aporta el proceso de dilución se calcula en el peor de los casos. En el ejemplo presentado, debido a las pipetas y matraces utilizados, el cálculo corresponde a la preparación del patrón de 50 mg/L. A la pipeta de 5 mL le corresponde una incertidumbre de 0,12% y al matraz aforado de 100 mL le corresponde una incertidumbre de 0,046%. Si la preparación de patrones se hubiera realizado de forma independiente para cada ensayo, el término de la preparación podría considerarse incluido en la precisión del sistema instrumental. Finalmente, la suma cuadrática de las dos contribuciones permite obtener como incertidumbre del patrón un valor de 0,31%.

La incertidumbre del sistema instrumental ( $U_{\text{sistema instrumental}}$  %) se calcula a partir de la información obtenida en el estudio de linealidad (Tabla VIII).

La cuantificación se realiza por interpolación de la señal de la muestra en la recta de calibrado, por lo que se escoge el peor de los valores obtenidos. En aquellos casos en que se cuantifique por factor de respuesta se escogerá el valor correspondiente al patrón de cuantificación empleado.

La incertidumbre asociada a la muestra ( $U_{\text{muestra}}$  %) se calcula a partir de la información obtenida en el estudio de la repetibilidad y la exactitud expresada como sesgo. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla IX.

La Tabla X resume los resultados obtenidos de incertidumbre  $u$  (%) a los diferentes niveles de concentración, obtenidos como suma cuadrática de las contribuciones del patrón, sistema instrumental y muestra. La tolerancia (%) se calcula como  $2 * u$  (%) y se utiliza para definir los intervalos de concentraciones dentro de los cuales cabe esperar se encuentre el valor verdadero.

**TABLA VIII**

**Incertidumbre del sistema instrumental.**

| Patrón (mg/L) | C.V. (%) | Nº replicados | $U_{\text{precisión}}$ (%) | $U_{\text{exactitud}}$ (%) | $U_{\text{sistema instrumental}}$ (%) |
|---------------|----------|---------------|----------------------------|----------------------------|---------------------------------------|
| 5             | 0,38     | 3             | 0,22                       | 2,55                       | 2,56                                  |
| 10            | 0,0      | 3             | 0,0                        | 0,81                       | 0,81                                  |
| 20            | 0,21     | 3             | 0,12                       | 0,38                       | 0,39                                  |
| 40            | 0,20     | 3             | 0,12                       | 0,12                       | 0,16                                  |
| 50            | 0,28     | 3             | 0,16                       | 0,90                       | 0,92                                  |
| 80            | 0,03     | 3             | 0,02                       | 0,32                       | 0,32                                  |

**TABLA IX**

**Incertidumbre asociada a la muestra.**

| Nivel de concentración (mg/L)      | $U_{\text{precisión}}^1$ (%) | $U_{\text{exactitud}}$ (%) | $U_{\text{muestra}}$ (%) |
|------------------------------------|------------------------------|----------------------------|--------------------------|
| 50                                 | 0,14                         | 1,71                       | 1,71                     |
| 500                                | 0,75                         | 0,19                       | 0,77                     |
| 6000                               | 0,69                         | 0,61                       | 0,92                     |
| <sup>1</sup> nº replicados (n) = 3 |                              |                            |                          |

**TABLA X**

**Incertidumbre y tolerancia.**

| Nivel de concentración (mg/L) | $U_{\text{patrón}}$ (%) | $U_{\text{sistema instrumental}}$ (%) | $U_{\text{muestra}}$ (%) | $u$ (%) | Tolerancia (%) | Intervalo (mg/L) |
|-------------------------------|-------------------------|---------------------------------------|--------------------------|---------|----------------|------------------|
| 50                            | 0,31                    | 2,56                                  | 1,71                     | 3,1     | 6,2            | 47-53            |
| 500                           | 0,31                    | 2,56                                  | 0,77                     | 2,7     | 5,4            | 470-530          |
| 6000                          | 0,31                    | 2,56                                  | 0,92                     | 2,7     | 5,5            | 5700-6300        |



## 5. CONCLUSIONES

Para poder calcular la incertidumbre asociada a los resultados de un ensayo, con la información obtenida durante la validación del procedimiento de análisis, es necesario definir convenientemente en el protocolo de validación las actividades que permitan determinar la contribución del patrón y el sistema instrumental utilizados, así como la influencia de la precisión y la exactitud de los resultados de la muestra.

Para el análisis de cloruros por HPLC en muestras de lixiviados, la mayor contribución a la incertidumbre del resultado la aporta el sistema instrumental pues la influencia de la muestra y patrones no es significativa.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- <sup>(1)</sup>. UNE-EN-ISO 17025: 2005, «Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración».
- <sup>(2)</sup>. Monografía de AEFI (Asociación Española de farmacéuticos de la industria): «Validación de métodos analíticos». Ed. AEFI. Marzo 2001.
- <sup>(3)</sup>. «VIM Vocabulario Internacional de Metrología». 3ª edición, 2006.
- <sup>(4)</sup>. Norma ISO 5725: «Application de la statistique - Exactitud (justesse et fidélité) des résultats et methods de mesure», 1994.
- <sup>(5)</sup>. AOAC: «Oficial Methods of Analysis». Appendix D: Guidelines for collaborative Study Procedures to Validate Characteristics of a Method of Analysis. 2002.
- <sup>(6)</sup>. AOAC: «Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals». 2002.
- <sup>(7)</sup>. AOAC: «International Methods. Committee Guidelines for validation of Qualitative and Quantitative Food. Microbiological Official Methods of Analysis». *Journal of AOAC International*, vol. 85, No. 5, 2002.
- <sup>(8)</sup>. EURACHEM Guide 1998: «The Fitness for Purpose of Analytical Methods: A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics».
- <sup>(9)</sup>. «Principles and Practices of Method Validation». AOAC/FAO/IAEA/IUPAC. November 1999.
- <sup>(10)</sup>. «ICH Harmonised Tripartite Guideline. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1)». Noviembre 2005.
- <sup>(11)</sup>. 2.2.46. «Chromatographic separation techniques» (01/2005), «General Notices apply to all monographs and other texts» (pág. 69 – 72) – *European Pharmacopeia* 5.0.
- <sup>(12)</sup>. «Validación de procedimientos farmacopeicos» <1225>, *Información general* (pág. 749 – 752) - USP 30.
- <sup>(13)</sup>. «Guidance for Industry. Validation of analytical. Procedures: Methodology». FDA. *Center for Veterinary Medicine*. July 1999.
- <sup>(14)</sup>. «Review Guidance. Validation of analytical. Procedures: Methodology». FDA. *Center for Veterinary Medicine*. July 1999.
- <sup>(15)</sup>. «Guidance for methods development and methods validation for the RCRA program». April 1992.
- <sup>(16)</sup>. «Guidelines on method validation to be performed in support of analytical methods for agrochemical formulations». CIPAC. Version 3807.
- <sup>(17)</sup>. «Guidance for Industry. Bioanalytical method validation». FAO. May 2001.
- <sup>(18)</sup>. «Gestión de equipos en laboratorios de análisis químico», J. Báguena, M.J. Blanco. *Afinidad*, Vol. 63, nº 523, 7-12, mayo-junio 2006.
- <sup>(19)</sup>. «EURACHEM/CITAC Guide number 4. Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement». Second Edition 2000.