

1. OBJETIVO

Establecer los lineamientos que debe cumplir el Laboratorio Nacional de Suelos (LNS) durante la validación /verificación de métodos de ensayo (no normalizados, desarrollados o diseñados por el laboratorio, métodos normalizados utilizados fuera del alcance previsto, así como las ampliaciones y modificaciones de los métodos normalizados), con el fin de demostrar la competencia para obtener resultados confiables.

2. ALCANCE

Este Instructivo aplica para todos los procesos de validación/verificación desarrollados por el Laboratorio Nacional de Suelos (LNS), en los temas de química, física, mineralogía y biología.

Según la norma ISO/IEC 17025, el laboratorio debe verificar los métodos normalizados. Validar los métodos no-normalizados, diseñados y/o desarrollados por el Laboratorio, métodos normalizados empleados fuera del alcance previsto, ampliaciones y modificaciones de los métodos normalizados, para garantizar que los métodos son aptos en las condiciones del laboratorio y asegurando que puede lograr el desempeño requerido.

3. DESARROLLO

3.1. GENERALIDADES

- Todos los funcionarios y contratistas que intervienen en el proceso deben cumplir con las precauciones y medidas de seguridad descritas en el instructivo vigente "Medidas de seguridad en la ejecución de análisis".
- El proceso se debe efectuar bajo condiciones de aireación, iluminación, temperatura, humedad relativa y servicios de agua potable y desionizada, adecuados para la correcta ejecución del ensayo.
- Verificar el cumplimiento de parámetros de control de calidad del agua para análisis
- Revisar que el material se encuentre perfectamente limpio y seco conforme con el instructivo vigente "Limpieza de áreas de trabajo y material de laboratorio".
- Asegurar que los equipos a utilizar se encuentren en condiciones normales de operación y cumplan con la verificación e identificación.
- Las muestras son tratadas previamente de acuerdo con lo establecido en la norma NTC-ISO 11464.
- La bolsa que contiene la muestra de suelo a analizar no debe ser extraída de su correspondiente caja marcada con el número de laboratorio correspondiente para evitar que la muestra pierda su identidad.
- Pesar y manipular el suelo utilizando guantes de nitrilo y los respiradores para material particulado.
- La etapa de pesaje de la muestra se realiza en el cuarto de balanzas, la manipulación de la muestra se debe realizar en la mesa designada para evitar la contaminación cruzada de las muestras.
- Registrar el uso de los equipos en el formato vigente "Control de operación, comprobación y mantenimiento rutinario de equipos".
- Dejar los equipos utilizados queden en condiciones adecuadas para trabajar al terminar la determinación.
- Utilizar esfero o tinta indeleble al diligenciar los formatos vigentes ya que todo registro debe ser legible y verificable.
- Los periodos de retención de los registros serán los que se determinen en las tablas de retención documental-TRD vigentes.

3.2. REFERENCIAS

- ICONTEC, 2017. *NORMA TÉCNICA COLOMBIANA NTC-ISO/IEC 17025 Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración.*

- Eurolab España. P.P. Morillas y colaboradores. Guía Eurachem: *La adecuación al uso de los métodos analíticos – Una Guía de laboratorio para la validación de métodos y temas relacionados* (1ª ed. 2016), disponible en www.eurachem.org.
- Instituto de Salud Pública de Chile. *Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: “Aspectos Generales sobre la Validación de Métodos”*. Santiago, 2010, disponible en:
<<http://www.ispch.cl/sites/default/files/documento/2010/12/guia_tecnica_1_validacion_de_mtodos.pdf>>
- NTC 3529-2:1999. *Exactitud -Veracidad Y Precisión- De Métodos de Medición y Resultados*. Parte 2: Método Básico para la Determinación de Repetibilidad y Reproducibilidad en Método Normalizado de Medición.
- Instituto de Hidrología, Metrología y Estudios Ambientales (IDEAM). *Protocolo de Estandarización de Métodos Analíticos*.
- Barnett, W. (1984). *A calibration algorithm for atomic absorption*. Gran Bretaña

3.3. CARACTERÍSTICAS

Este instructivo presenta las actividades y características generales que deben ser consideradas durante la validación/verificación de un método de ensayo normalizado, modificado o desarrollado por el Laboratorio Nacional de Suelos (LNS). Este documento aplica al desarrollo de las validaciones/confirmaciones de los métodos analíticos empleados en los temas de química, física, mineralogía y biología.

El LNS debe verificar que se realicen correctamente los métodos antes de introducirlos asegurando que puede lograr el desempeño requerido.

De acuerdo con la norma NTC ISO 9000:2015 se entiende por validación la confirmación, mediante la aportación de evidencia objetiva, de que se han cumplido los requisitos para una utilización o aplicación específica prevista. Derivada de esta definición la validación de un método se interpreta como el proceso que permite confirmar que un método en cuestión tiene las capacidades de desempeño consistentes que se requieren para su aplicación (conforme al propósito).

La validación de un método proporciona información de las capacidades de desempeño y de las limitaciones del mismo que pueden ser experimentadas durante su uso rutinario, mientras este se encuentre bajo control. Los criterios para establecer si los métodos se encuentran bajo control están estipulados en los instructivos vigentes “Elaboración, análisis y evaluación cartas control y duplicados” y “Aseguramiento de calidad de los procesos analíticos”.

Tanto en la validación/verificación como en los criterios relacionados con el control del método está implícito que el LNS utiliza equipos dentro de especificaciones y sometidos a control metrológico y que, además, el analista que realiza los ensayos es competente técnicamente. El proceso de validación/verificación para los métodos de ensayo utilizados en el LNS, contempla la satisfacción de más necesidades del cliente y la adecuación para los ensayos previstos.

Existen diferentes criterios utilizados para la realización de una validación/Verificación dentro del LNS, los siguientes parámetros deben ser evaluados según el alcance del proceso:

Tabla 1. Criterios para realizar una validación/verificación

Métodos Normalizados	Métodos modificados de un método normalizado	Métodos Internos
Verificación, se debe determinar (cuando aplique): <ul style="list-style-type: none"> ◦ Límites (Límite de detección instrumental, Límite de detección, Límite de cuantificación) ◦ Intervalo de trabajo (Linealidad) ◦ Sensibilidad (pendiente) ◦ Precisión (repetibilidad y reproducibilidad) ◦ Exactitud o veracidad (sesgo, recuperación) ◦ Incertidumbre ◦ Estabilidad 	Requiere validación parcial, se debe determinar (cuando aplique): <ul style="list-style-type: none"> ◦ Límites (Límite de detección instrumental, Límite de detección, Límite de cuantificación) ◦ Intervalo de trabajo (Linealidad) ◦ Sensibilidad (pendiente) ◦ Selectividad ◦ Precisión (repetibilidad y reproducibilidad) ◦ Exactitud o veracidad (sesgo, recuperación) ◦ Robustez ◦ Incertidumbre ◦ Estabilidad 	Requiere validación completa y se debe determinar (cuando aplique): <ul style="list-style-type: none"> ◦ Límites (Límite de detección instrumental, Límite de detección, Límite de cuantificación) ◦ Intervalo de trabajo (Linealidad) ◦ Sensibilidad (pendiente) ◦ Precisión (repetibilidad y reproducibilidad) ◦ Exactitud o veracidad (sesgo, recuperación) ◦ Robustez ◦ Incertidumbre ◦ Estabilidad

Los protocolos y el alcance de la validación/verificación no siempre son los mismos, por lo tanto, se deben establecer los límites para cada una de las determinaciones analíticas. Los procedimientos de análisis deben ser validados/verificados por personal idóneo.

La validación/Verificación debe ser tan exhaustiva como sea necesario para responder a las necesidades de la aplicación del método. Se debe tener presente que los datos biológicos generalmente tienen una distribución de Poisson, por lo cual debe evaluarse su ajuste a la distribución normal y en caso contrario estadísticos no paramétricos.

Para llevar a cabo los procedimientos detallados de validación/verificación, se pueden tomar como referencia documentos disponibles en internet, provenientes de instituciones reconocidas, tales como: Eurachem, ISO, CENAM, IUPAC, entre otros.

Cuando se realicen cambios en un método validado/verificación, el LNS debe determinar la influencia de dichos cambios y, cuando se determine que afectan la validación/verificación vigente, se debe realizar una nueva validación/verificación del método.

El Laboratorio Nacional de Suelos debe asegurar de que cuando se realicen modificaciones a las validaciones/verificaciones estas sean trazables y se pueda establecer cuál es la versión vigente de la validación/verificación que en todos los casos deben corresponder a las versiones vigentes del método aplicado.

El desarrollo de un método interno se debe evaluar periódicamente para que corresponda al alcance y requisitos previamente establecidos para su uso. Cualquier modificación al plan de desarrollo debe ser aprobada y autorizada.

3.4. INSUMOS

Es muy importante realizar una revisión del estado de los elementos requeridos para la realización del proceso, como se denota a continuación:

- Documentación: Se debe hacer una revisión de todos los instructivos establecidos por el LNS para poder desarrollarlos métodos, la norma o documento de referencia.

- Equipos e insumos.
- Personal.

3.5. PROCEDIMIENTO

Para realizar cualquiera de las validaciones/verificaciones se deben tener en cuenta las siguientes etapas generales: planificación, experimentación y elaboración del informe, cuyas características se presentan a continuación y las cuales se deben aplicar en todos los procesos de validación/verificación.

3.5.1. PLANIFICACIÓN:

Etapas que comprende el establecimiento de las condiciones y el alcance de la validación/verificación, para cada método objeto de evaluación.

3.5.1.1. ESTABLECIMIENTO DE LAS CONDICIONES:

Consiste en una revisión del estado de los elementos requeridos para la realización del proceso, como se denota a continuación:

- **Documentación:** Dentro de los documentos requeridos están los instructivos establecidos por el LNS para los métodos, la norma o documento de referencia, los instructivos de equipos de medición requeridos, los certificados de calidad de patrones y muestras de referencia, los registros de calibración y verificación de los equipos requeridos y las cartas control.
- **Equipos e insumos (reactivos, patrones y materiales de referencia):** éstos deben contar con las especificaciones técnicas establecidas. Además, los reactivos y las diferentes soluciones requeridas deben poseer vigencia de uso y los equipos a emplear deben tener control metrológico vigente.
- **Personal:** La designación para la ejecución, supervisión y aprobación del proceso debe considerar que el personal seleccionado cuente con las competencias necesarias para el desarrollo del mismo.

3.5.1.2. ALCANCE DE LA VALIDACIÓN/VERIFICACIÓN

La determinación del alcance se realiza a partir de la selección de los parámetros de calidad, teniendo en cuenta lo establecido en la Tabla 1. Criterios para realizar una validación/verificación.

Los resultados de la etapa de planificación se documentan en el formato vigente "Planificación de la validación/verificación de los métodos del Laboratorio Nacional de Suelos – LNS". En el diligenciamiento de este formato, tenga en cuenta las siguientes recomendaciones:

- Seleccionar el método para el analito a determinar especificando la matriz.
- Realizar una revisión bibliográfica de la metodología oficial utilizada y mantener este material disponible (una validación/verificación se debe sustentar debidamente).
- Establecer las variaciones con respecto al documento de referencia, así como la necesidad de estudios comparativos. Éstos indicarán los análisis preliminares requeridos (determine si es requerida una verificación o una validación completa o parcial, ver Tabla 1. Criterios para realizar una validación/verificación). Determinar el alcance de la validación/verificación, buscando el principio de la técnica analítica, las interferencias o limitaciones y la importancia del análisis (esta información debe ser dispuesta también en los instructivos del método).
- Consignar además de los instructivos, normas y manuales requeridos, los certificados de patrones y muestras de referencia, registros de calibración y verificación de equipos críticos.
- Establecer los controles de calidad de equipos críticos, reactivos y soluciones preparadas.
- Registrar la lista de materiales y equipos a utilizar.
- Consignar la lista de reactivos requeridos y los patrones y muestras de referencia.
- Definir los responsables de la ejecución de las pruebas, de los análisis estadísticos, de la supervisión y aprobación técnica del proceso de validación/verificación.

3.5.2. EXPERIMENTACIÓN:

Etapas que comprende la caracterización de los parámetros de calidad del método y la determinación

de su desempeño.

3.5.2.1. CARACTERIZACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE CALIDAD:

En el caso de que la validación y/o verificación se realiza por medio del ensayo de muestras, éstas deben ser homogéneas.

En el caso de que el método que se va a validar o verificar tenga una gama amplia de aplicación, se deben agrupar los productos (matrices según la afinidad) y luego seleccionar los productos para hacerla validar o verificar.

En el caso de que se requiera preparar adiciones de estándares para una matriz de aguas o suelos u otras para realizar las validaciones o las muestras de rutina, éstas adiciones se deben añadir antes de que se lleve a cabo el proceso de análisis, con la finalidad de garantizar la recuperación del analito.

Realizar de acuerdo con lo establecido en el alcance de la validación/verificación, los cálculos estadísticos asociados y comparar con los criterios de aceptación. Para la caracterización se deben aplicar los siguientes criterios, según tipo de análisis:

A continuación, se describen los parámetros mediante los cuales se evalúa el rendimiento de un método y se especifica el tipo de materiales a analizar y ensayos a efectuar para evaluar cada atributo en la validación/verificación.

Para evaluar los criterios la precisión, exactitud, porcentaje de recuperación e incertidumbre se deben analizar un grupo de "muestras" conformadas por:

- BK = Blanco del método.
- Eb = Estándar de concentración baja; aproximadamente 2 veces el límite de cuantificación.
- Em = Estándar de concentración media; aprox. El 50% del rango
- Ea = Estándar de concentración alta; debe ser aprox. El 90% del rango.
- M1 = Muestra para ver efectos de la matriz real.
- M2 = Muestra para ver efectos de la matriz real. Si es posible concentración mayor a la de M1.
- M1A.b = M1 fortificada con un nivel bajo, máximo el 30% del valor de M1.
- M1A.a = M1 fortificada con un nivel alto, mínimo el 50% del valor de M1.
- MR = Material de referencia.

Del grupo básico de muestras se deben analizar mínimo 10 mediciones de cada una. Los estándares Eb, Em y Ea deben ser leídos por mínimo dos analistas, cada uno con un mínimo de 7 lecturas.

Con los resultados de cada grupo de muestras se debe evaluar la distribución normal de los datos y la existencia de datos atípicos. Los datos atípicos se estiman con el test de Grubbs, máximo se podrá descartar un dato.

Todo el material de vidrio deberá ser lavado previamente de acuerdo con el procedimiento establecido en el laboratorio según su uso y deberá ser sometido a la revisión o control de calidad.

El formato de captura de datos se deberá diligenciar en el mismo momento en que se obtienen los datos (no transcribir, copiar, etc.).

Realizar de acuerdo con lo establecido en el alcance de la validación/verificación, incluir los cálculos

estadísticos asociados y los criterios de aceptación.

Para la caracterización se deben aplicar los siguientes criterios, según tipo de análisis:

Tabla 2. Análisis fisicoquímicos

PARÁMETRO DE CALIDAD	FORMA DE DETERMINACIÓN (DISEÑO EXPERIMENTAL)	CÁLCULOS ESTADÍSTICOS (cuando aplique)/ CRITERIOS DE ACEPTACIÓN
Selección de la longitud de onda analítica óptima ⁽¹⁾	Realizar un barrido espectral en los espectrofotómetros a utilizar, según rango del equipo. Utilizar un patrón intermedio de la curva de calibración preparado a partir de un reactivo grado analítico con certificado de calidad. El parámetro de calidad "Selección de la longitud de onda analítica óptima" no aplica para los métodos volumétricos, gravimétricos y potenciométricos.	Determinar la longitud de onda de máxima absorción y blanco de reactivos con valor de absorbancia igual a cero o el más cercano a cero.
Intervalo lineal (intervalo óptimo de concentración) ⁽¹⁾	Construir curva de Ringbom preparando una serie de soluciones del analito, dependiendo de la determinación analítica. Se evalúan soluciones patrón del analito en un intervalo que contenga mínimo 10 puntos de medición, que se deben medir de forma independiente tres veces. Las soluciones patrón deben prepararse a partir de un reactivo grado analítico con certificado de calidad.	Construir las curvas con los valores de absorbancia (A) en la ordenada y el log de la concentración en la abscisa y determinar el rango lineal. Los resultados permiten obtener posteriormente curvas de calibración que tengan una relación lineal.
		Para las 5 curvas de calibración resultantes, determinar la respectiva ecuación y coeficiente de regresión lineal. Para verificar si existe regresión lineal entre la cantidad de analito y la respuesta dada por el instrumento realizar las siguientes pruebas estadísticas: <ul style="list-style-type: none"> ◦ Un análisis de varianza para cada una de las curvas, asumiendo como hipótesis nula (H0): No existe relación alguna entre la respuesta del instrumento y la cantidad de analito. El criterio de aceptación es que se rechace H0. ◦ Realizar las siguientes pruebas t para un nivel de confianza del 95% y n-2 grados de libertad donde n es el número total de

PARÁMETRO DE CALIDAD	FORMA DE DETERMINACIÓN (DISEÑO EXPERIMENTAL)	CÁLCULOS ESTADÍSTICOS (cuando aplique)/ CRITERIOS DE ACEPTACIÓN
<p>Linealidad⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾ (construcción de curvas de calibración)</p>	<p>A partir de los resultados de las curvas Ringbom, construir una curva de calibración que contenga mínimo 5 puntos. Los puntos seleccionados se deben medir de forma independiente 5 veces, bajo las mismas condiciones de trabajo.</p> <p>El parámetro de calidad "Linealidad" no aplica para los métodos volumétricos, gravimétricos y potenciométricos.</p>	<p>determinaciones de y: - Prueba t para el coeficiente de correlación, r.</p> $t = \frac{ r \sqrt{n-2}}{\sqrt{1-r^2}}$ <p>Donde: r = Coeficiente de correlación. r² = Coeficiente de determinación. n = Número de réplicas.</p> <p>Se asume como H₀: r = 0. El criterio de aceptación es que se rechace H₀. ° Prueba para la pendiente, m</p> $t = \frac{m}{S_m}$ $S_m = DS = \frac{S_{y/x}}{\sqrt{\sum(X_i - \bar{X})^2}}$ <p>Donde: \bar{X} = Promedio de concentraciones.</p> <p>Se asume como H₀: m = 0. El criterio de aceptación es que se rechace H₀. ° Prueba para el intercepto, b.</p> $t = \frac{b}{S_b}$ $S_b = DS = S_{y/x} \sqrt{\frac{\sum(X_i)^2}{n\sum(X_i - \bar{X})^2}}$ <p>Se asume como H₀: b = 0. El criterio de aceptación es que se acepta H₀.</p> <p>Para m y b.</p> $S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum(y_i - \bar{y}_i)^2}{n-2}}$ <p>Donde:</p>

PARÁMETRO DE CALIDAD	FORMA DE DETERMINACIÓN (DISEÑO EXPERIMENTAL)	CÁLCULOS ESTADÍSTICOS (cuando aplique)/ CRITERIOS DE ACEPTACIÓN
<p>Correlación datos de curva de calibración (Modelos no lineales)⁽¹⁾⁽³⁾⁽⁴⁾</p>	<p>Construir una curva de calibración que contenga mínimo 5 puntos. Los puntos seleccionados se deben medir de forma independiente 5 veces, bajo las mismas condiciones de trabajo. Este parámetro de calidad aplica para curvas de calibración ajustadas a modelos no-lineales con intercepto en Cero en el equipo de absorción atómica.</p>	<p>Valores de y_i y x_i calculados y ajustados (Se calculan a partir de la ecuación de regresión).</p> <p>Para las 5 curvas de calibración se determina la respectiva ecuación y el coeficiente de regresión, la cual se presenta a continuación para el caso de absorción y emisión:</p> <ul style="list-style-type: none"> ° Absorción: $\frac{A}{C}K_1 - AK_2 + \frac{A^2}{C}K_3 = -1$ Donde: <ul style="list-style-type: none"> A = Absorbancia C = Concentración del analito en estudio K_1, K_2, K_3 = Constantes de proporcionalidad. ° Emisión: $\frac{Em}{C}K_1 - EmK_2 + \frac{Em^2}{C}K_3 = -1$ Dónde: <ul style="list-style-type: none"> Em = Emisión C = Concentración del analito en estudio K_1, K_2, K_3 = Constantes de proporcionalidad. <p>Para verificar si existe correlación entre la cantidad de analito y la respuesta dada por el instrumento realizar las siguientes pruebas estadísticas:</p> <ul style="list-style-type: none"> ° Un análisis de varianza para cada una de las curvas, asumiendo como hipótesis nula (H0): No existe relación alguna entre la respuesta del instrumento y la cantidad de analito. El criterio de aceptación es que se rechace H0. ° Realizar las siguientes pruebas t para un nivel de confianza del 95% y n-2 grados de libertad donde n es

PARÁMETRO DE CALIDAD	FORMA DE DETERMINACIÓN (DISEÑO EXPERIMENTAL)	CÁLCULOS ESTADÍSTICOS (cuando aplique)/ CRITERIOS DE ACEPTACIÓN
		<p>el número total de determinaciones</p> <ul style="list-style-type: none"> Prueba t para el coeficiente de correlación, r. $t = \frac{ r \sqrt{n-2}}{\sqrt{1-r^2}}$ <p>Donde:</p> <ul style="list-style-type: none"> r = Coeficiente de correlación r = Coeficiente de 2 = determinación n = Número de réplicas. <p>Se asume como H0: r = 0. El criterio de aceptación es que se rechace H0.</p> <ul style="list-style-type: none"> Prueba para las constantes de proporcionalidad, K1, K2 y K3 $t = \frac{K}{S_k}$ $S_k = \frac{S_{y/x}}{\sqrt{\sum(X_i - \bar{X})^2}}$ <p>Donde:</p> <ul style="list-style-type: none"> \bar{X} = Promedio de la variable que multiplica a las constantes de proporcionalidad ($\frac{A}{c}$, $-A$ ó $\frac{A^2}{c}$) K = Constante de proporcionalidad en estudio. <p>Se asume como H0: m = 0. El criterio de aceptación es que se rechace H0.</p> $S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum(y_i - \bar{y}_i)^2}{n-2}}$ <p>Donde:</p> <ul style="list-style-type: none"> $S_{y/x}$ = Valores de y ajustados (Se calculan a partir de la ecuación de regresión).

PARÁMETRO DE CALIDAD	FORMA DE DETERMINACIÓN (DISEÑO EXPERIMENTAL)	CÁLCULOS ESTADÍSTICOS (cuando aplique)/ CRITERIOS DE ACEPTACIÓN
Sensibilidad ⁽¹⁾	<p>El valor de ésta corresponde al promedio de las pendientes de las curvas de calibración obtenidas en los ensayos de verificación o validación. La sensibilidad permite observar la capacidad de respuesta instrumental frente a una determinada cantidad de analito.</p> <p>Para el caso de curvas de calibración no lineales la sensibilidad se determina como $m = -1/k_1$</p> <p>El parámetro de calidad "Sensibilidad" no aplica para los métodos volumétricos, gravimétricos y potenciométricos.</p>	<p>Determinarla por el método de ajuste lineal.</p> <p>En caso de curvas de calibración no lineales la pendiente de la regresión se determina como:</p> $m = \frac{-1}{K_1}$ <p>Donde: m = Pendiente de la regresión K_1 = Constante de proporcionalidad 1</p>
Límite de detección instrumental (LDI) ⁽¹⁾	<p>Analizar de diez (10) a veinte (20) blancos del método (BK) diferentes medidos una vez cada uno. Calcular la desviación estándar de los resultados (como concentración).</p> <p>El parámetro de calidad "LDI" no aplica para los métodos volumétricos, gravimétricos y potenciométricos.</p>	<p>$LDI = 1,645 s.$</p> <p>Dónde: s = Desviación estándar de los resultados</p> <p>Criterio de aceptación: se deben leer los blancos en una curva que cumpla con un $r^2 > 0,9995$</p>
Límite de detección del método (LDM) ⁽¹⁾	<p>Analizar como mínimo diez (10) veces el estándar medido independientemente según el procedimiento. La concentración del estándar debe ser equivalente a cuatro veces el LDI. Calcular la desviación estándar (s) de los diez datos y multiplicar por el valor t-student, para los respectivos grados de libertad, Donde t se selecciona a partir de una tabla de distribución desigual para $n-1$ grados de libertad y un nivel de confianza del 99%.</p> <p>Si no se puede determinar el límite de detección del método a partir del LDI, se determina de acuerdo con el límite de cuantificación práctico (primer punto de la curva de calibración), esto se hace preparando estándares 2.5</p>	<p>$LDM = t .s$</p> <p>Dónde: t = Valor de la t-student para los respectivos grados de libertad y nivel de confianza del 99% s = Desviación estándar de los resultados</p> <p>El criterio de aceptación para el límite de detección es que el Coeficiente de variación deben ser $\leq 50\%$ y %Error relativo $\leq 20\%$.</p>

PARÁMETRO DE CALIDAD	FORMA DE DETERMINACIÓN (DISEÑO EXPERIMENTAL)	CÁLCULOS ESTADÍSTICOS (cuando aplique)/ CRITERIOS DE ACEPTACIÓN
	<p>veces menor al límite de cuantificación práctico o realizando diluciones sucesivas hacia abajo, hasta obtener una exactitud y precisión de acuerdo con los criterios de aceptación</p> <p>El parámetro de calidad "LDM" no aplica para los métodos volumétricos, gravimétricos y potenciométricos.</p>	
<p>Límite de cuantificación del método (LCM)⁽¹⁾</p>	<p>Analizar como mínimo diez (10) veces el estándar medido independientemente según el procedimiento. La concentración del estándar debe ser equivalente a 2.5 veces el LDM. Calcular la desviación estándar (s) de los diez datos y multiplicar por el valor <i>t-student</i>, para los respectivos grados de libertad, Donde t se selecciona a partir de una tabla de distribución desigual para n-1 grados de libertad y un nivel de confianza del 99%. El criterio de aceptación para el límite de detección es que el Coeficiente de variación deben ser ≤ 50% y %Error relativo ≤20%.</p> <p>Si este criterio NO se cumple, preparar un patrón de concentración un poco más alta y realizar nuevamente los ensayos y así sucesivamente hasta lograr los niveles aceptados de precisión y exactitud. Cuando se cuenta con datos históricos se debe proceder con la verificación del límite de cuantificación establecido estadísticamente.</p> <p>El parámetro de calidad "LCM" no aplica para los métodos volumétricos, gravimétricos y potenciométricos</p>	$LCM = t \cdot s$ <p>Dónde: t= Valor de la <i>t-student</i> para los respectivos grados de libertad y nivel de confianza del 99% s= Desviación estándar de las resultados</p> <p>El criterio de aceptación para el límite de detección es que el Coeficiente de variación deben ser ≤ 50% y %Error relativo ≤20%.</p>
<p>Precisión del sistema (repetibilidad instrumental)</p>	<p>Analizar tres patrones del analito bajo estudio, con diferentes niveles de concentración (alto, medio, bajo). El patrón debe ser reactivo analítico con certificado de calidad. Medir cada uno de forma independiente 10 veces, bajo las mismas condiciones de trabajo.</p> <p>Aplica para métodos volumétricos,</p>	<p>Determinar la desviación estándar (DS) y el coeficiente de variación. Según el analito en estudio el CV debe ser ≤10 % para aguas y tejido vegetal y ≤ 20% para suelos, o lo estipulado por la norma de referencia.</p>

PARÁMETRO DE CALIDAD	FORMA DE DETERMINACIÓN (DISEÑO EXPERIMENTAL)	CÁLCULOS ESTADÍSTICOS (cuando aplique)/ CRITERIOS DE ACEPTACIÓN
	gravimétricos e instrumentales analíticos y potenciométricos	
Precisión intermedia del sistema (Reproducibilidad instrumental)	Analizar los mismos patrones utilizados en la precisión del sistema, medir cada uno de forma independiente 10 veces, realizados por mínimo 2 analistas, el mismo equipo y en 3 días diferentes. Aplica para métodos volumétricos, gravimétricos e instrumentales analíticos y potenciométricos	Aplicar un análisis de varianza (ANOVA), asumiendo como hipótesis nula (H0): No existe diferencia significativa a entre los ensayos realizados. El criterio de aceptación es que se acepte H0.
Precisión del método (repetibilidad del método)	Analizar la muestra de suelo de control interno 10 veces. Para este parámetro se puede utilizar la información de las cartas control bajo las mismas condiciones de trabajo del mismo analista. Aplica para métodos volumétricos, gravimétricos e instrumentales analíticos	Determinar la desviación estándar (DS) y el coeficiente de variación (CV). Según el analito en estudio el CV debe ser ≤10 % para aguas y tejido vegetal y ≤ 20% para suelos, o lo estipulado por la norma de referencia.
Precisión intermedia del método (reproducibilidad del método)	Para este parámetro utilizar la información de las cartas control o, en su defecto, analizar la misma muestra utilizada en la precisión del método, 10 veces, analizada por mínimo 2 analistas, el mismo equipo y en 3 días diferentes. Aplica para métodos volumétricos, gravimétricos	Aplicar un análisis de varianza (ANOVA), asumiendo como hipótesis nula (H0): No existe diferencia significativa a entre los ensayos realizados. El criterio de aceptación es que se acepte H0.
Exactitud (en su componente veracidad)	Analizar muestras de referencia certificada (MRC), con dos o tres niveles diferentes de concentración (alto, medio, bajo) midiendo cada una de forma independientes, 10 veces, bajo las mismas condiciones de trabajo.	Según la determinación analítica, aplicar uno de los siguientes criterios: ◦ El error relativo con respecto al estándar analizado no debe superar el 20% $\%Error = \frac{ X - X_{ref} }{X_{ref}} * 100\%$ X = Promedio de las mediciones del estándar

PARÁMETRO DE CALIDAD	FORMA DE DETERMINACIÓN (DISEÑO EXPERIMENTAL)	CÁLCULOS ESTADÍSTICOS (cuando aplique)/ CRITERIOS DE ACEPTACIÓN
		<p>de referencia realizadas por el laboratorio</p> <p>X_{ref} = Valor teórico del estándar de referencia</p> <p>$\%Error$ = Error relativo</p> <p>° Aplicar la siguiente prueba t-student.</p> $t = \frac{(X - X_{ref}) \sqrt{n}}{S}$ <p>Donde:</p> <p>t = Estadístico t calculado</p> <p>X = Promedio de las mediciones de la MRC realizadas por el laboratorio</p> <p>Xref = Valor de consenso reportado en el certificado de la MRC</p> <p>n = Número de veces que se analiza la MRC en el laboratorio</p> <p>S = Desviación estándar de las mediciones realizadas por el laboratorio.</p> <p>Se asume como H0 = no hay evidencia de error sistemático, X = Xref</p> <p>El criterio de aceptación es que se acepta H0.</p> <p>° Calcular la recuperación relativa en porcentaje</p> $R(\%) = \frac{X}{X_{ref}} \times 100$ <p>El criterio de aceptación es un R (%) entre 90 - 107%.</p>
Intervalo de trabajo instrumental	El extremo inferior está determinado por el límite de cuantificación y el límite superior de la curva de cuantificación (lineal o no lineal).	<p>Establecer el valor encontrado para el límite de cuantificación del instrumento y el valor del límite superior del rango lineal.</p> <p>Para el límite superior determinar la desviación estándar (DS) y el coeficiente de variación. Según determinación analítica se establece</p>

PARÁMETRO DE CALIDAD	FORMA DE DETERMINACIÓN (DISEÑO EXPERIMENTAL)	CÁLCULOS ESTADÍSTICOS (cuando aplique)/ CRITERIOS DE ACEPTACIÓN
		el criterio de aceptación.
Intervalo de trabajo del método	<p>El extremo inferior está determinado por el límite de cuantificación en unidades de resultado de la determinación analítica.</p> <p>Para el límite superior analizar mínimo cinco veces una muestra de ensayo, según el procedimiento establecido para la determinación analítica, que de acuerdo con los criterios de interpretación del LNS corresponda a un rango alto de concentración (Ea).</p>	<p>Establecer el valor encontrado para el límite de cuantificación del método, en unidades de resultado de la determinación analítica, y el límite superior con el valor obtenido para una muestra de ensayo en rango alto de concentración.</p> <p>Para el límite superior determinar la desviación estándar (DS) y el coeficiente de variación. Según determinación analítica se establece el criterio de aceptación.</p>

- (1) Parámetros en general considerados propios del desarrollo de un método analítico
- (2) Este parámetro de calidad aplica para curva de calibración lineal.
- (3) Los parámetros de prueba de varianza de la regresión, pendiente o constantes de proporcionalidad e intercepto de la pendiente se pueden realizar mediante la herramienta de análisis de datos Excel, "regresión".
- (4) Este parámetro de calidad se establece de acuerdo con el artículo de Barnett William "A calibration algorithm for atomic absorption". Para ver más detalles de la referencia ver numeral 3.2.

Tabla 3. Análisis biológicos

PARÁMETRO DE CALIDAD	FORMA DE DETERMINACIÓN (DISEÑO EXPERIMENTAL)	CÁLCULOS ESTADÍSTICOS (cuando aplique)/ CRITERIOS DE ACEPTACIÓN
Límite de detección (métodos cualitativos) o cuantificación (métodos cuantitativos)	<p>Es el número mínimo de organismos dentro de una variabilidad definida que pueden detectarse bajo las condiciones experimentales del método evaluado. Se realiza por duplicado.</p> <p>Para ello se inoculan las muestras con valores normales que pueden ir decreciendo decimalmente o se diluye la muestra. Se determina con la evaluación de recuperación en el rango más bajo, cruzando frente a otra técnica de conteo directo, por ejemplo (cámara de Neubauer).</p>	<p>Deberá construirse una curva de respuesta para determinar la máxima dilución a la cual ocurre la detección.</p> <p>Deberá construirse una curva de respuesta para determinar la máxima dilución a la cual se realiza la cuantificación, es decir la siguiente a la cual ya no exista crecimiento o respuesta evidente del organismo.</p>

PARÁMETRO DE CALIDAD	FORMA DE DETERMINACIÓN (DISEÑO EXPERIMENTAL)	CÁLCULOS ESTADÍSTICOS (cuando aplique)/ CRITERIOS DE ACEPTACIÓN
Linealidad	Se inoculan las muestras con valores máximos que pueden ir decreciendo decimalmente (aumento en la dilución). Se cuantifica la respuesta. Se realiza por duplicado.	Graficar la respuesta de medición en función de la concentración (número de organismos) del organismo. Se verifica mediante la obtención de un coeficiente de correlación cercano a 1.
Límites de trabajo (métodos cualitativos)	<p>Límite inferior de detección y determinación. Numéricamente debería expresarse como el número inferior suficiente de colonias o partículas por conjunto de detección. Se realizan por duplicado.</p> <p>Límite superior. Región de número de colonias donde los recuentos se vuelven inciertos para servir de base a una determinación válida.</p> <p>Se determina con la evaluación de recuperación en el rango más bajo o más alto, cruzando frente a otra técnica de conteo directo, (por ejemplo, cámara de Neubauer).</p>	Debe construirse una curva de respuestas para determinar la máxima y mínima dilución a la cual se realiza la cuantificación, es decir, la siguiente dilución a la cual ya no exista crecimiento o respuesta evidente del organismo. El límite inferior corresponde al límite de cuantificación o detección.
Robustez	Identificar las variables que pueden tener un efecto significativo en el desempeño del método. Establece experimentos (analizando materiales de referencias, empleando muestras con cantidades o de composición conocida para observar el efecto sobre la variable respuesta, o materiales certificados) para observar el efecto sobre la exactitud y la precisión de variables que se van cambiando sistemáticamente. Se analiza una vez cada serie de condiciones experimentales.	<p>Se determina y analiza el efecto de cada cambio sobre la media variable respuesta.</p> <p>Se clasifican las variables de mayor a menor efecto sobre el desempeño del método. Ejemplo:</p> <ul style="list-style-type: none"> ° Tiempo de agitación pre-incubación (tiempo 1 Vs. Tiempo 2). ° Cantidad de medio de cultivo (cantidad 1 Vs cantidad 2). ° Concentración de microorganismos en la muestra. ° Composición de la suspensión de dilución. ° Tiempo de incubación (tiempo 1 Vs. tiempo 2).
Repetibilidad	Patrones, materiales de referencia o blanco de muestra fortificados a varias concentraciones en el intervalo de trabajo. Para la repetibilidad se analizan 6 o más muestras (de ser posible 10), por duplicado, por parte del mismo analista, equipo y laboratorio dentro de un periodo corto de tiempo (el mismo día).	$sr^2 = \frac{\sum(d)^2}{2n}$ <p>Donde;</p> <p>d = Diferencia entre los duplicados.</p> <p>n = Número de pares de</p>



VALIDACIÓN - VERIFICACIÓN DE LOS MÉTODOS ANALÍTICOS EN EL LABORATORIO NACIONAL DE SUELOS-LNS

Código: IN-GAG-PC03-33

Versión: 1

Vigente desde: 18/05/2021

PARÁMETRO DE CALIDAD	FORMA DE DETERMINACIÓN (DISEÑO EXPERIMENTAL)	CÁLCULOS ESTADÍSTICOS (cuando aplique)/ CRITERIOS DE ACEPTACIÓN
		duplicados.
Reproducibilidad	Este parámetro se evalúa con la desviación estándar de una serie de medidas y se modela matemáticamente por la distribución de Poisson. Para reproducibilidad se realiza cambios en los parámetros mencionados en la repetibilidad, particularmente los analistas. Se analizan 6 o más muestras (de ser posible 10).	$SR^2 = \frac{\sum(da)^2}{2n}$ <p>Donde;</p> <p>da = Diferencia de los duplicados entre analistas</p> <p>n = Número de pares de duplicados.</p>
Productividad	Con cultivos de la cepa (blancos) en fase estacionaria en una concentración de 10^8 , se inocula una asada en 30 unidades con medio de cultivo. Este parámetro es básico para la evaluación de nuevos medios de cultivo cuando se quieren tener medios alternativos.	Se calcula el ICA teniendo en cuenta que el valor máximo debe ser de 5 (0,16667 para cada unidad). Donde;
		<p>ICA = 4,5 a 5, medios altamente productivos</p> <p>ICA = 2,5 a 4,5, medios medianamente productivos</p> <p>ICA < 2,5, medios poco productivos</p> <p>ICA = 0, medios no productivos.</p>
Especificidad	Método A: Fracción del número total de cultivos o colonias negativos que son asignados correctamente con el método utilizado o sea capacidad del método de dar negativo cuando las muestras no tienen el analito. Se inocula un aproximado de 30 unidades con medio de cultivo con una asada de una suspensión 10^8 , a partir del cultivo de cepa interferente en fase estacionaria y se determina la proporción de estos que dan resultados negativos. Si existieran positivos, estos deben ser falsos positivos. Este parámetro es básico para la evaluación de nuevos medios de cultivo cuando se quieren tener medios alternativos.	$\% = \frac{NV}{(DPC + NV)} \times 100$ <p>Donde:</p> <p>NV = Número de negativos verdaderos</p> <p>DPC = Número de falsos positivos.</p>

PARÁMETRO DE CALIDAD	FORMA DE DETERMINACIÓN (DISEÑO EXPERIMENTAL)	CÁLCULOS ESTADÍSTICOS (cuando aplique)/ CRITERIOS DE ACEPTACIÓN																								
Productividad	<p>Método B: (cuando se quiere validar un método alternativo frente a uno de referencia).</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>Réplica</th> <th>Método a validar</th> <th>Método referencia</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td rowspan="3">Cepa blanco</td> <td>1</td> <td></td> <td>+/-</td> </tr> <tr> <td>...</td> <td></td> <td>+/-</td> </tr> <tr> <td>5</td> <td></td> <td>+/-</td> </tr> <tr> <td rowspan="3">Cepa interferente</td> <td>1</td> <td></td> <td>+/-</td> </tr> <tr> <td>...</td> <td></td> <td>+/-</td> </tr> <tr> <td>5</td> <td></td> <td>+/-</td> </tr> </tbody> </table>		Réplica	Método a validar	Método referencia	Cepa blanco	1		+/-	...		+/-	5		+/-	Cepa interferente	1		+/-	...		+/-	5		+/-	$\% = \frac{NV}{(DP_c + NV)} \times 100$ <p>Donde: NV = Número de negativos verdaderos. DPc = Número de positivos falsos.</p>
	Réplica	Método a validar	Método referencia																							
Cepa blanco	1		+/-																							
	...		+/-																							
	5		+/-																							
Cepa interferente	1		+/-																							
	...		+/-																							
	5		+/-																							
Productividad	<p>Luego cuantificar:</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>Resultado método de referencia +/-</th> <th>Resultado método de referencia -/-</th> <th>Total</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Resultado método a validar +</td> <td>+/+ (PV)</td> <td>+/- (DP)</td> <td>PV + DP</td> </tr> <tr> <td>Resultado método a validar -</td> <td>-/+ (DN)</td> <td>-/- (NV)</td> <td>DN + NV</td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>PV + DN</td> <td>DP + NV</td> <td>N</td> </tr> </tbody> </table>		Resultado método de referencia +/-	Resultado método de referencia -/-	Total	Resultado método a validar +	+/+ (PV)	+/- (DP)	PV + DP	Resultado método a validar -	-/+ (DN)	-/- (NV)	DN + NV	Total	PV + DN	DP + NV	N									
	Resultado método de referencia +/-	Resultado método de referencia -/-	Total																							
Resultado método a validar +	+/+ (PV)	+/- (DP)	PV + DP																							
Resultado método a validar -	-/+ (DN)	-/- (NV)	DN + NV																							
Total	PV + DN	DP + NV	N																							
Sensibilidad	<p>Método A: Es la fracción del número total de cultivos o colonias positivos que son correctamente asignados con el método utilizado. Evidencia la capacidad del método de dar positivo cuando las muestras contienen el organismo blanco. Se inocula según la cantidad que especifique el método, un aproximado de 60 unidades con medio de cultivo de una suspensión decreciente desde 10⁸ a partir del cultivo blanco en fase estacionaria y se determina la proporción de estos que dan resultados positivos. Aquellos que den negativo son falsos negativos.</p>	$S\% = \frac{PV}{(DN_c + PV)} \times 100$ <p>Donde: PV = Número de positivos verdaderos DNc = Número de negativos falsos confirmados.</p>																								
	<p>Método B: (cuando se quiere validar un método alternativo frente a uno de referencia). Se basa en lo indicado para el parámetro de especificidad, método B.</p>	$S\% = \frac{PV}{(DN_c + PV)} \times 100$ <p>Donde: PV = Número de positivos verdaderos DNc = Número de negativos falsos confirmados.</p>																								

PARÁMETRO DE CALIDAD	FORMA DE DETERMINACIÓN (DISEÑO EXPERIMENTAL)	CÁLCULOS ESTADÍSTICOS (cuando aplique)/ CRITERIOS DE ACEPTACIÓN
Concordancia o exactitud relativa	Es la capacidad del método de dar resultados semejantes cuando se aplica repetidamente en una muestra. Método A: Cuando no se tiene un método de referencia, se realizan seis repeticiones de la misma muestra por parte del mismo analista y sin variar otras condiciones.	$CV\% = \frac{S}{\bar{x}} \times 100$ <p>Donde;</p> <p>S = Desviación estándar de las repeticiones Media de las repeticiones, para calcular el coeficiente de variación.</p>
	Método B: Cuando existe método de referencia. La precisión relativa se comprueba evaluando la concordancia entre los resultados repetidos sobre una muestra del método evaluado y los obtenidos utilizando el método de referencia. Se usa la tabla indicada para el parámetro Especificidad método B.	$S_m \times 100$ <p>Donde:</p> <p>S_m = Desviación estándar de las repeticiones de los dos métodos y = Media de las repeticiones de los dos métodos para calcular el coeficiente de variación.</p> $E\% = \frac{PV + NV}{(PV + NV + DN + DP)} \times 100$ <p>Donde:</p> <p>PV = Número de positivos verdaderos NV = Número de negativos verdaderos DN = Número de falsos negativos DP = Número de falsos positivos</p>
Falsos positivos (métodos cualitativos)	Es la probabilidad que el ensayo arroje un resultado positivo cuando la muestra no tiene el analito. Se basa en lo indicado para el parámetro de especificidad método B.	$F+ = \frac{DP_c}{DP + NV}$ <p>o también:</p> $F+ = 1 - \text{especificidad}$
Falsos negativos (métodos cualitativos)	Es la probabilidad que el ensayo arroje un resultado negativo aun cuando la muestra tiene el analito. Se basa en lo indicado para el parámetro de especificidad método B.	$F- = \frac{DN_c}{(DN + PV)}$ <p>o también:</p> $F- = 1 - \text{sensibilidad}$
Sesgo	Es la diferencia entre el promedio del resultado obtenido para el análisis por el método en comparación con uno de similar o superior resolución los participantes del laboratorio 1 y el valor asignado del material de referencia	$\text{sesgo} = \bar{X}_i - \text{valor asignado}$ <p>Donde;</p> <p>i = Cada analista participante.</p>

PARÁMETRO DE CALIDAD	FORMA DE DETERMINACIÓN (DISEÑO EXPERIMENTAL)	CÁLCULOS ESTADÍSTICOS (cuando aplique)/ CRITERIOS DE ACEPTACIÓN
	(prueba interlaboratorios). Se debe definir qué tanta variación se acepta.	
Veracidad	Grado de concordancia entre el valor aceptado como verdadero convencional o un valor de referencia y el valor encontrado.	Se prueba la hipótesis alterna de desigualdad de las medias del contenido medido y el contenido adicionado, asumiendo igualdad de varianzas.

3.6. DETERMINACIÓN DEL DESEMPEÑO.

Consiste en contrastar los resultados de la caracterización de los parámetros de calidad con los criterios de aceptación para poder establecer el desempeño del método. Se debe presentar, en el informe de validación/Verificación una justificación de la declaración de aceptación del método, aprobando del proceso de validación/verificación.

Eventualmente, algunos parámetros de calidad pueden presentar valores que difieren en alguna extensión del criterio de aceptación, pero no impiden la declaración de aceptación de la aptitud del método. En estos casos se debe presentar, en el informe de validación/verificación una justificación de la decisión adoptada, por parte del responsable técnico y el responsable de aprobación del proceso de validación/verificación.

3.7. ELABORACIÓN DEL INFORME:

Todos los datos relevantes del proceso de validación/Verificación de un método, como la ejecución y la totalidad de los resultados obtenidos se deben documentar en el formato vigente "Informe de la validación/Verificación de los métodos analíticos del laboratorio Nacional de Suelos-LNS", de manera que se posibilite la trazabilidad de todas las actividades realizadas.

- El informe debe incluir los siguientes aspectos:
 - Fecha de realización del informe
 - Determinación analítica
 - **Objeto:** debe hacer referencia al método y a su uso
 - **Alcance:** especifica la matriz en la que se desarrolla el método y las condiciones relevantes para las que se aplica el método
 - **Responsables:** se debe especificar el responsable de la ejecución de los ensayos, el de la supervisión técnica y el de la aprobación de la validación/verificación del método analítico.
 - **Parámetros de calidad:** se enumeran los parámetros que se establecieron en la planificación para el método.
 - **Materiales de referencia utilizados:** se indican las especificaciones técnicas relevantes.
 - **Equipos utilizados en la validación/verificación:** se indican las especificaciones técnicas relevantes.
 - **Método analítico:** no se requiere una descripción detallada, sino hacer referencia precisa al Instructivo vigente en el laboratorio para el método evaluado.
 - **Determinación de los parámetros de calidad y los criterios de aceptación:** se presenta en una matriz de cinco columnas, así: parámetro de calidad, forma de evaluación del parámetro, criterio de aceptación, resultado (incluir los datos estadísticos obtenidos en la validación/verificación) y conformidad.

- **Interpretación de los resultados:** se debe realizar un análisis para cada parámetro orientado a establecer su incidencia en la validación/verificación del método.
- Conclusiones: se sintetiza el resultado del proceso en cuanto a cumplimiento o no de los requisitos establecidos.
- **Declaración de la conformidad:** consiste en la manifestación formal respecto a la confiabilidad y reproducibilidad que se le pueden atribuir o no a los resultados que se generen con la utilización del método en el laboratorio, y debe incluir las condiciones relevantes en que se da el cumplimiento o incumplimiento de los requisitos y el campo de aplicación.

3.8. DOCUMENTACIÓN DEL PROCESO DE VALIDACIÓN/VERIFICACIÓN DE LOS MÉTODOS ANALÍTICOS

Las actividades de validación/verificación de cada método de ensayo deben estar debidamente documentadas. En el laboratorio, esta documentación está constituida por los siguientes documentos:

- Formato vigente "Informe de la validación/verificación de los métodos analíticos del Laboratorio Nacional de Suelos-LNS"
- Formato vigente "Planificación de la validación/verificación de los métodos del Laboratorio Nacional de Suelos-LNS"
- Formato vigente "Cálculos de validación/verificación de métodos"
- Los soportes de pruebas preliminares (Cuando aplique).
- Captura de datos y análisis estadísticos.

3.9. VERIFICACIÓN DE LOS MÉTODOS ANALÍTICOS

Se llevará a cabo cuando se introduzcan cambios al método, tales como equipos, insumos y condiciones en que se desarrolle el método, previo establecimiento de la influencia de dichos cambios en los resultados.

Por otra parte, se debe evaluar durante el uso rutinario del método la aparición de evidencias que indiquen que el método no está bajo control, como por ejemplo a través de cartas control y duplicados.

La verificación de los métodos analíticos, se delegará por parte del Coordinador del GIT Laboratorio Nacional de Suelos, de acuerdo con las actividades y responsabilidades que se establezcan en la planificación de la verificación diligenciando el formato vigente "Planificación de la validación/verificación de los métodos del Laboratorio Nacional de Suelos- LNS" y se realizará teniendo en cuenta lo siguiente:

- Verificación de los métodos analíticos en equipos.
 - Por entrada en uso de equipos de mayor tecnología que incluyen aspectos tales como sensibilidad, exactitud e incertidumbre.
 - Calibraciones de acuerdo con la ejecución del plan metrológico anual.
- Verificación de los métodos analíticos en analistas.
 - Por cambio de analistas a través de los resultados de carta control de las diferentes determinaciones.
- Verificación de los métodos analíticos en condiciones operativas.
 - Por cambios o modificaciones en espacios físicos
 - Cambios procedimentales (insumos y operación)
- Control y evaluación del método analítico.
 - Seguimiento y revisión periódica de cartas control y de resultados de pruebas interlaboratorios.

3.10. ESTADÍSTICAS DE POSIBLE USO EN EL PROCESO DE VALIDACIÓN/VERIFICACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

3.10.1. PRUEBA F

Se utiliza para comparar las varianzas de dos poblaciones utilizando la razón de las varianzas

muestrales, para determinar si su distribución normal, varía o es la misma.

Para esta prueba se parte de la siguiente hipótesis nula: "No hay una diferencia significativa entre el valor de las varianzas muestrales".

Para aprobar o rechazar la hipótesis realice los siguientes pasos:

1. Determine el valor de la varianza para cada una de las dos series de datos del parámetro bajo estudio, sabiendo que:

$$\text{Varianza} = S^2$$

2. Una vez tiene el valor de la varianza de la serie de datos 1 (S_1^2) y de la serie de datos 2 (S_2^2), calcule el estadístico de prueba F:

$$F = \frac{S_1^2}{S_2^2}$$

En donde el valor del numerador debe corresponder al de la varianza con el mayor valor.

3. Determine los grados de libertad (GL) para cada serie de datos, sabiendo que:

Donde n es igual al número de datos registrados

$$GL = n - 1$$

4. Encuentre el valor de F_{tab} (en una tabla para este estadístico). Sobre la tabla busque primero los grados de libertad de la serie de datos 2 y luego relaciónelos con los de la serie de datos 1, para hallar F tenga en cuenta el intervalo de confianza establecido.
 5. Compare el valor de F calculado con el valor de F_{tab} , si el F calculado es menor que el F_{tab} no se rechaza la hipótesis nula y se concluye que, para el intervalo de confianza establecido, no existe suficiente evidencia, para decir que entre las dos varianzas existen diferencias significativas.
- **Límites de Confianza:** La magnitud del intervalo de confianza, que se deriva de la desviación estándar de la muestra, depende de la exactitud de S, es decir, de la cercanía de la desviación estándar de la muestra a la verdadera desviación estándar.

La desviación estándar calculada a partir de una serie pequeña de datos puede ser incierta, razón por la cual, necesariamente los límites de confianza deben ser más amplios. Para justificar la variabilidad de S, se utiliza un parámetro estadístico importante, el valor t (t de Student), que depende del nivel de confianza deseado (90, 95 ó 99%) y del número de grados de libertad (número de datos, n) con que se calculó S.

$$\text{Intervalo de confianza} = \bar{X} - \left(t \times \frac{S}{\sqrt{n-1}} \right), \bar{X} + \left(t \times \frac{S}{\sqrt{n-1}} \right)$$

3.10.2. PRUEBA t

Se utiliza para comparar las medias de dos poblaciones que tienen comportamiento normal y de las cuales se han tomado muestras que no tienen la misma varianza, para determinar, si su distribución normal varía o es la misma.

Para esta prueba se parte de la siguiente hipótesis nula: "No hay una diferencia significativa entre el valor de las medias de las poblaciones".

Para aprobar o rechazar la hipótesis realice los siguientes pasos:

1. Calcule la media \bar{X}_1 y la varianza S_1^2 para la serie de datos 1, con n_1 observaciones realizadas.
2. Calcule la media \bar{X}_2 y la varianza S_2^2 para la serie de datos 2, con n_2 observaciones realizadas.
3. Calcule el estadístico de prueba t:

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\sqrt{\frac{S_1^2}{n_1} + \frac{S_2^2}{n_2}}}$$

4. Encuentre el valor de t_{tab} , (en una tabla este estadístico) para un valor de grados de libertad = n_1+n_2-2
5. Compare el valor de t calculado con el valor de t_{tab} , si la t calculada es menor que el t_{tab} no se rechaza la hipótesis nula y se concluye que, al intervalo de confianza establecido, no existe suficiente evidencia para decir que entre las dos medias existen diferencias significativas.

3.10.3. PRUEBA NO PARAMÉTRICA DE MANN-WHITNEY

Para comparación de 2 medianas (cuando se trabaja con datos cuya distribución no es normal) – reemplaza la prueba de t-Student.

Esta prueba estadística es útil cuando las mediciones se pueden ordenar en escala ordinal (es decir, cuando los valores tienden a una variable continua, pero no tienen una distribución normal) y resulta aplicable cuando las muestras son independientes.

Este procedimiento es una buena alternativa cuando no se puede utilizar la prueba t de Student, en razón de no cumplir con los requisitos que esta prueba exige.

$$U_1 = n_1 \times n_2 + \frac{n_1(n_1 + 1)}{2} - \sum R_1$$

La fórmula es la siguiente:

Donde:

$$U_2 = n_1 \times n_2 + \frac{n_2(n_2 + 1)}{2} - \sum R_2$$

U_1 y U_2 = Valores estadísticos de U Mann-Whitney.

n_1 = Tamaño de la muestra del grupo 1

n_2 = Tamaño de la muestra del grupo 2.

R_1 = Sumatoria de los rangos del grupo 1.

R_2 = Sumatoria de los rangos del grupo 2.

Aplique los siguientes pasos:

1. Determine el tamaño de las muestras (n_1 y n_2). Si n_1 y n_2 son menores que 20, se consideran muestras pequeñas, pero si son mayores que 20, se consideran muestras grandes.
2. Arregle los datos en rangos del menor al mayor valor. En caso de que existan ligas o empates de

- rangos iguales, se deberán detectar para un ajuste posterior.
3. Calcule los valores de U_1 y U_2 , de modo que se elija el más pequeño para comparar con los críticos de U Mann-Whitney en una tabla de probabilidades asociadas con valores pequeños como los de U en la prueba de Mann-Whitney.
 4. En caso de muestras grandes, calcule el valor Z , pues en estas condiciones la distribución se aproxima a la normal.
 5. En caso de que el valor de U calculado no se localice en las tablas correspondientes, se transformará en la fórmula siguiente: $U = n_1 n_2 - U'$. En esta fórmula, U' corresponde al valor más alto.
 6. Decida si se acepta o rechaza la hipótesis. Si la probabilidad de U es más pequeña que el nivel de significancia, se acepta H_a y se rechaza H_o .
 7. Para muestras de más de 25 datos, se determina el valor Z como sigue:

$$Z = \frac{U - \bar{U}}{s_U}$$

Donde:

- Z = Valor estadístico de la curva normal.
- U = Cualquier valor de U calculado (ya sea U_1 o U_2).
- \bar{U} = valor promedio de U .
- s_U = desviación estándar de U .

8. Calcule el valor promedio de U (\bar{U}):

$$\bar{U} = \frac{n_1 \times n_2}{2}$$

9. La desviación estándar de U se determina de la siguiente forma:

$$s_U = \sqrt{\left(\frac{n_1 \times n_2}{N(N-1)}\right) \times \left(\frac{N^3 - N}{12} - \sum L_i\right)}$$

Donde:

- s_U = desviación estándar de U .
- n_1 y n_2 = Tamaño de la muestra de los grupos 1 y 2.
- N = Tamaño total de la muestra (la suma de n_1 y n_2).
- L_i = Sumatoria de los empates.

El cálculo de L_i se realiza de la siguiente manera:

$$L_i = \sum \frac{L_i^3 - L_i}{12}$$

3.10.4. PRUEBA NO PARAMÉTRICA DE KRUSKAL-WALLIS

Para comparación de múltiples medianas (cuando se trabaja con datos cuya distribución no es normal)- reemplaza prueba F .

La extracción de las muestras debe ser aleatoria, no tiene más exigencia. De este modo, este contraste

es el que debe aplicar necesariamente cuando no se cumple algunas de las condiciones que se necesitan para aplicar el análisis de la varianza (ANOVA). Al igual que las demás técnicas no paramétricas, ésta se apoya en el uso de los rangos asignados a las observaciones.

El número total de elementos en todas las muestras es: $N=n_1 + n_2 + \dots + n_k$ La hipótesis a contrastar es:

H_0 : Las k muestras provienen de la misma población.

H_a : alguna proviene de una población con mediana diferente a las demás.

El modo de realizar el contraste es el siguiente:

1. Se ordenan las observaciones de menor a mayor, asignando a cada una de ellas su rango (1 para la menor, 2 para la siguiente, N para la mayor).
2. Para cada una de las muestras, se calcula R_i , siendo $i=1, k$, como la suma de los rangos de las observaciones que les corresponden. Si H_0 es falsa, cabe esperar que esas cantidades sean muy diferentes.
3. Se calcula el estadístico:

$$H = \frac{12}{N(N+1)} \times \sum_{i=1}^k \frac{R_i^2}{n_i} - 3(N+1)$$

4. La regla para decidir si se ha de rechazar o no la hipótesis nula es la siguiente:

- Si el número de muestras es $k=3$ y el número de observaciones en cada una de ellas no pasa de 5, se rechaza H_0 , si el valor de H supera el valor teórico que se encuentra en una tabla de Kruskal-Wallis.
- En cualquier otro caso, se compara el valor de H con el de una tabla de la Chi cuadrado con $k-1$ grados de libertad. Se rechaza H_0 si el valor del estadístico supera el valor teórico Chi cuadrado con $k-1, 1-\alpha$.

4. CONTROL DE CAMBIOS

FECHA	CAMBIO	VERSIÓN
18/05/2021	<ul style="list-style-type: none"> ◦ Se adopta como versión 1 debido a cambios en la Plataforma Estratégica (actualización del mapa de procesos), nuevos lineamientos frente a la generación, actualización y derogación de documentos del SGI tales como: cambios de tipos documentales y nueva codificación por procesos. Emisión Inicial Oficial. ◦ Se actualiza la guía "Validación/confirmación de métodos analíticos", código G40600-02/18.V5, versión 5, a instructivo "Validación - Verificación de los Métodos Analíticos en el Laboratorio Nacional de Suelos-LNS" código, IN-GAG-PC03-33, versión 1. ◦ Se deroga la circular número 234 del 31 de agosto de 2018. ◦ Se asocia al procedimiento "Análisis de Muestras en el Laboratorio Nacional de Suelos", código PC-GAG-03, versión 1. ◦ Se eliminó la tabla de contenido y se reorganizaron todos los capítulos. ◦ Se incluye el capítulo de generalidades, referencias y características. ◦ Se define el objetivo y alcance del instructivo. ◦ Se profundizó en cuanto a la caracterización de los parámetros de calidad establecidos para análisis fisicoquímicos. Se incluyó el parámetro de calidad cuando las curvas de calibración corresponden a modelos no lineales. ◦ Se eliminó el uso de los formatos: 	1



VALIDACIÓN - VERIFICACIÓN DE LOS MÉTODOS ANALÍTICOS EN EL LABORATORIO NACIONAL DE SUELOS-LNS

Código: IN-GAG-PC03-33

Versión: 1

Vigente desde: 18/05/2021

FECHA	CAMBIO	VERSIÓN
	<ul style="list-style-type: none"> ◦ Intervalo óptimo de concentración para el método analítico ◦ Linealidad del método analítico ◦ Límites de detección, de cuantificación instrumental y del método ◦ Precisión del sistema (instrumental) ◦ Precisión intermedia del sistema (instrumental) ◦ Precisión del método analítico ◦ Precisión intermedia del método analítico ◦ Exactitud del método analítico (con prueba t-student) ◦ Exactitud del método analítico (con porcentaje de recuperación) ◦ Se cambió la palabra confirmación y reconfirmación por verificación. ◦ Se eliminó el anexo 1 y anexo 2 	
<p>31/08/2018</p>	<ul style="list-style-type: none"> ◦ Se modificó el título de la guía antes denominada "Validación y cálculo de incertidumbre general de métodos analíticos" ahora "Validación/confirmación de métodos analíticos", debido a la ampliación de los temas tratados en la guía. ◦ Se eliminó los aspectos relacionados con la estimación de incertidumbre y se incluyó la definición de validación a partir de lo descrito en la norma NTC ISO 9000:2015. Se incluyeron en la Tabla 1, los criterios para realizar una confirmación. ◦ Se modificó el ítem de montaje de la técnica por la planificación y se incluyó el establecimiento de condiciones y alcance de la validación/confirmación. ◦ Se incluyó la caracterización de los parámetros de calidad y la determinación del desempeño. Se modificó la Tabla N°2 Análisis fisicoquímicos, con respecto a los criterios a aplicar y la expresión de parámetros de rendimiento por parámetros de calidad. ◦ Se eliminó el ítem de estadística y se incluyó el ítem de elaboración del informe. ◦ Se eliminó la determinación de la incertidumbre y se incluyó documentación del proceso de validación/confirmación de los métodos analíticos. Se generaron 11 nuevos formatos para la ejecución del documento. ◦ Se eliminó el ítem de expresión del resultado. ◦ Se eliminó documentación y aprobación de informes incluidos en los numerales 2.3 y 2.4 ◦ Se modificó el Anexo 1. Antes denominado "Esquema general para determinar la incertidumbre total" ahora "Estadística de posible uso en el proceso de validación/confirmación de métodos analíticos", en el cual se eliminó el esquema general para determinar la incertidumbre total y se incluyó la estadística de posible uso en el proceso de validación/confirmación de métodos analíticos. 	<p>5</p>



**VALIDACIÓN - VERIFICACIÓN DE LOS MÉTODOS
ANALÍTICOS EN EL LABORATORIO NACIONAL DE
SUELOS-LNS**

Código: IN-GAG-PC03-33

Versión: 1

**Vigente desde:
18/05/2021**

Elaboró y/o Actualizó	Revisó Técnicamente	Revisó Metodológicamente	Aprobó
<p>Nombre: Sergio Andrés Arenas Nemogá</p> <p>Cargo: Contratista Subdirección de Agrología.</p> <p>Nombre: Johanna Katerin Cordero Casallas</p> <p>Cargo: Contratista Subdirección de Agrología.</p>	<p>Nombre: Vivian Lorena Álvarez Sarmiento</p> <p>Cargo: Coordinadora del GIT Laboratorio Nacional de Suelos</p> <p>Nombre: Janeth González Nivia</p> <p>Cargo: Coordinadora GIT Modernización y Administración de la Información Agrologica</p>	<p>Nombre: Marcela Yolanda Puentes Castrillón</p> <p>Cargo: Profesional especializado Oficina de Asesora de Planeación.</p>	<p>Nombre: Napoleón Ordoñez Delgado</p> <p>Cargo: Subdirector de Agrología</p>