

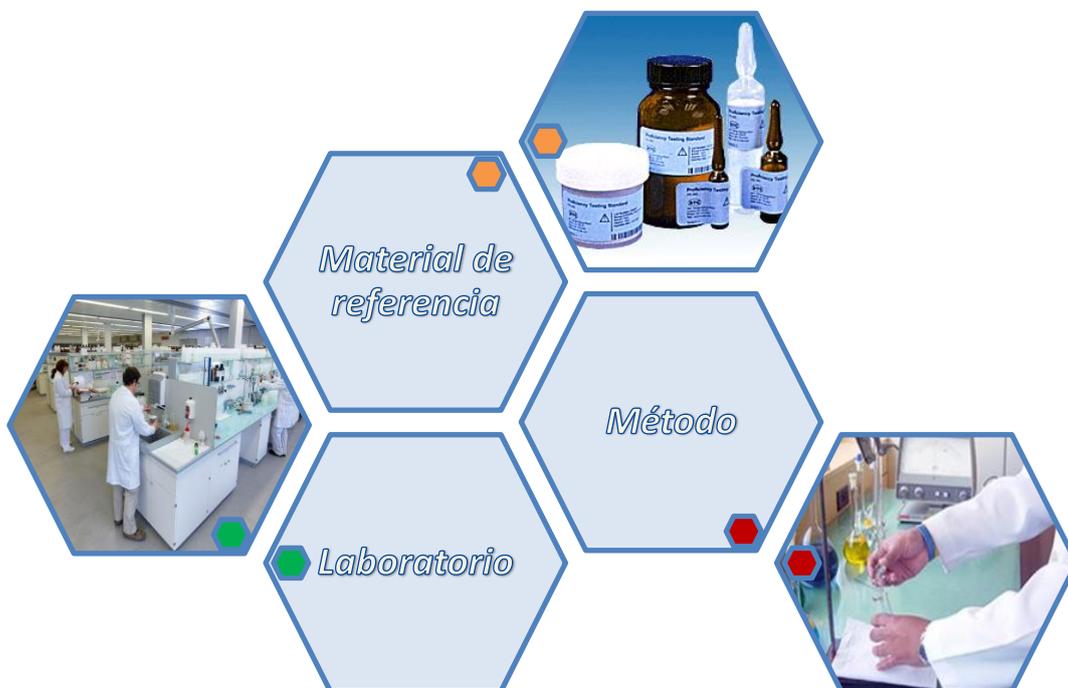


Universidad
de Sevilla

Facultad de
Farmacia



EJERCICIOS INTERLABORATORIO



-Juan Ternero Piña-



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Química Analítica

Grado en Farmacia

EJERCICIOS INTERLABORATORIO

Trabajo Fin de Grado

Revisión bibliográfica

-Juan Ternero Piña-

Tutora: *M^a Ángeles Herrador Morillo*

Sevilla, diciembre 2017



INDICE

	Página
RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	2
1.1. Calidad analítica	2
1.2. Calidad en el laboratorio analítico	4
1.3. Calidad del método analítico	6
1.4. Calidad del material de referencia	8
2. OBJETIVOS	11
3. METODOLOGÍA	11
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	13
4.1. Ejercicios Inter-laboratorio	13
4.1.1. Generalidades	13
4.1.2. Ensayos de Aptitud	15
4.1.3. Ensayos Colaborativos	18
4.1.4. Estudios de Certificación	22
4.1.5. Resumen comparativo de estos ejercicios	23
4.2. Ejemplos de sus aplicaciones	25
4.2.1. Determinación de cationes y aniones en agua	25
4.2.2. Determinación de proteínas en harina	28
4.2.3. Determinación de ácidos grasos poliinsaturados en grasas y aceites	30
4.2.4. Certificación de cipermetrina en té verde	32
4.3. Cronología de los ejercicios inter-laboratorios y su interés en farmacia	34
5. CONCLUSIONES	36
6. BIBLIOGRAFÍA	38

RESUMEN

La implantación de un sistema de calidad por parte de los laboratorios analíticos, conduce a obtener las mejoras necesarias con el fin de conseguir la excelencia en la información analítica. Este sistema de calidad debe ser evaluado internamente, por el propio laboratorio, y externamente, en forma de ejercicios o ensayos inter-laboratorios, a través de organismos independientes de prestigio. Dentro de la evaluación externa se pueden considerar tres variantes dependiendo del objeto de la evaluación: los *ensayos de aptitud*, en el que se evalúan las características de actuación de un laboratorio/s o analista/s; los *ensayos colaborativos* en el que se evalúan las características de los métodos de análisis; y los *estudios de certificación*, en el que se asigna el valor más probable (cantidad o concentración) de un componente en un determinado material, con una incertidumbre declarada. La organización y planificación de estos ejercicios corre a cargo de entidades públicas o privadas que, además, realizan el tratamiento estadístico de los resultados obtenidos por los distintos laboratorios participantes y emiten el correspondiente informe con las conclusiones finales. Se ha procedido a explicar, detalladamente, cada tipo de ensayo y a realizar un resumen comparativo de los mismos comentando sus principales características y se ha ilustrado, cada tipo de ensayo, con ejemplos de interés en farmacia realizando cálculos, a partir de datos primarios, y comentando los resultados obtenidos en cada ejemplo. Finalmente, se ha realizado una valoración cronológica del número de publicaciones sobre estos tipos de ejercicios inter-laboratorios desde su aparición hasta la actualidad y se ha llevado a cabo una estimación de los mismos en relación a sus aplicaciones en áreas de interés en farmacia, evaluando el impacto actual y futuro de estos ejercicios inter-laboratorio y su importancia en la calidad de la información suministrada por los laboratorios analíticos.

Palabras claves: Ejercicios interlaboratorio, ensayos de aptitud, ensayos colaborativos, ensayos de certificación, calidad analítica.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Calidad analítica

Para expresar qué se entiende por calidad existen una serie de definiciones en uso, cada una de las cuales será válida cuando se utilice en un determinado contexto. La revisión de este trabajo siempre se centrará sobre la calidad desde un punto de vista analítico. Teniendo en cuenta lo anterior, la calidad se puede definir como: El grado en que un conjunto de características inherentes cumple con los requisitos (ISO 9000, 2015), esta definición y contexto de calidad será el utilizado por aquellos que gestionan o evalúan el logro de la calidad.

La implantación de un sistema de calidad por parte de los laboratorios analíticos, no es suficiente por sí sola para garantizar resultados analíticos con la calidad requerida y para que esta calidad se mantenga a lo largo del tiempo (Compañó y Rios, 2002). Por lo tanto, la calidad no solo hay que planificarla, sino que también hay que controlarla y evaluarla. Ambos aspectos, control y evaluación, juegan un papel primordial para asegurar la fiabilidad de los resultados analíticos. Estos aspectos deben ser proporcionados tanto por el propio laboratorio (intra-laboratorio) como también debe ser avalada por otros organismos (inter-laboratorio) (Figura 1).

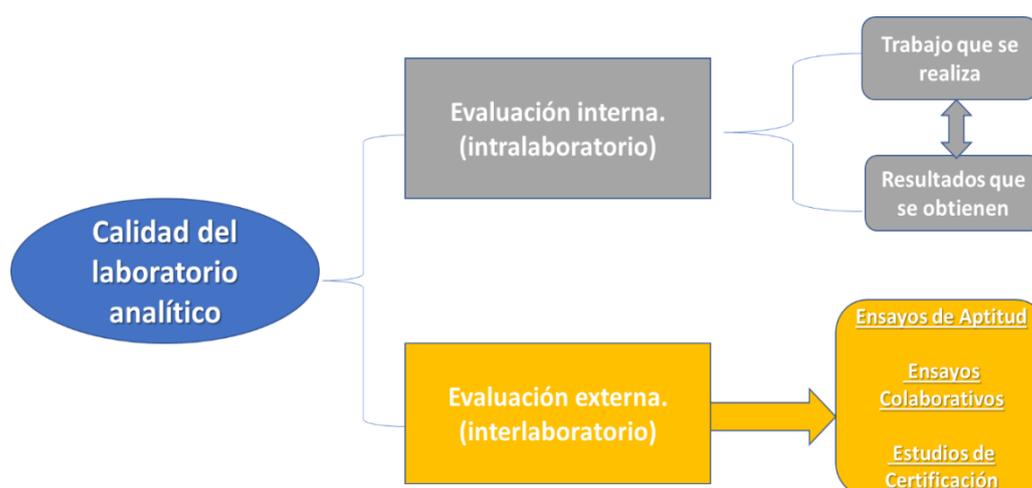


Figura 1.- Tipos de evaluaciones en el control de calidad del laboratorio analítico

Como se muestra en la Figura 1, cuando las actividades, de control y evaluación, se realizan en el seno del laboratorio, por su propio personal, se habla de Evaluación Interna de la Calidad y cuando se participa en ensayos inter-laboratorios para comparar y armonizar los resultados se habla de Evaluación Externa de la Calidad (Herrador, 2016).

En la evaluación interna hay que distinguir entre la calidad del trabajo realizado y la de los resultados obtenidos. Se puede trabajar con alta garantía de calidad un método deficiente, erróneo, y no obtener resultados correctos, o se puede obtener un resultado correcto y que se realice un mal trabajo, sin asegurar la reproducibilidad de los resultados. La consecución por tanto de resultados válidos no implica la certeza de realizar un trabajo de calidad. Por lo tanto, La calidad de los resultados requerida exige un determinado nivel de calidad en el trabajo que se realiza y viceversa (Valcárcel y Ríos, 2009).

Por su parte, la evaluación externa se puede plantear a tres niveles, la evaluación del propio laboratorio, de los métodos o de los materiales empleados; aspectos que se comentaran más adelante.

Es obvio que ambos conceptos de calidad, interna y externa, están relacionados y que para obtener un reconocimiento externo de la calidad de un laboratorio se requiere que dicho laboratorio tenga bien implantado y desarrollado un sistema de control interno de calidad lo que aseguraría mejores resultados en su evaluación externa (Valcárcel y Ríos, 2009). En resumen, la calidad externa depende de la calidad interna cuyo nivel de exigencia debe ser fijado.

El apartado 5.9 de la norma UNE EN-ISO/ICE 17025 (ISO 17025, 2015) hace referencia a las actividades de control de calidad de los laboratorios analíticos. Entre ellas, y que interesen en esta revisión, hay que citar, de forma específica, la utilización de métodos validados, el uso regular de MRC (Materiales de Referencia Certificados) y la participación en ensayos de aptitud que, a su vez, y de forma más genérica, se sostienen y presuponen, la utilización de equipos verificados, calibrados y con el mantenimiento adecuado; reactivos con las especificaciones adecuadas; patrones con la trazabilidad

establecida; operadores cualificados; instalaciones adecuadas (Compañó y Rios, 2002) y el uso de procedimientos estándares de trabajo. La norma UNE EN-ISO/ICE 17025 (ISO 17025, 2015) exige explícitamente participar en ensayos de aptitud, usar MRC y métodos validados.

1.2. Calidad en el Laboratorio analítico

La finalidad de los laboratorios analíticos es producir información que se materializa en los resultados analíticos (Valcárcel, 1999) y que debe ser relevante, confiable y útil para la toma de decisiones. Este hecho no es tan fácil de lograr en la práctica y muchos análisis no se realizan de forma correcta, y hay que repetirlos, lo que supone un coste económico adicional considerable, a lo que habría que añadir los efectos colaterales: el impacto legal, económico y social de las decisiones tomadas sobre la base de los resultados erróneos (Kellner y cols., 1998).

Estas circunstancias subrayan, no solamente la importancia de las medidas químicas, sino también la necesidad de garantizar, asegurar y demostrar su calidad a los consumidores o clientes en general, es decir, a todos aquellos que necesiten respuestas basadas en medidas analíticas (Valcárcel, 1999) (Riu y cols., 2001).

El beneficio básico y directo de establecer un sistema de Garantía de calidad, por parte de los laboratorios, en el que intervenga de forma externa auditores y laboratorios de referencia, consiste fundamentalmente en proporcionar una credibilidad asociada a la validación de estos terceros.

Además de este beneficio básico, existen otros beneficios añadidos para los laboratorios, como la clarificación de objetivos, la racionalización del trabajo, la optimización de recursos, la minimización de las decisiones, la reducción de improvisaciones, la formación y estímulo del personal, entre otros (Rodríguez-Benavides y Blanco-Sáenz, 2001).

Para alcanzar la calidad requerida en los resultados (fin último del laboratorio analítico), los laboratorios tienen que plantearse la propia calidad en su trabajo por lo que deben implicarse en todos los aspectos que suponen el trabajar dentro del marco de un sistema de calidad, admitido internacionalmente, como la única vía para que le sea reconocida su competencia a la hora de suministrar información correcta (Compañó y Rios, 2002).

En el caso de los laboratorios analíticos, se exige una aproximación específica, concretamente, el estándar internacional ISO/ICE 17025 (ISO 17025, 2015). En esta norma, ISO 17025, ya citada anteriormente, se define el conjunto de requisitos que debe cumplir un laboratorio de análisis para demostrar su competencia y su capacidad para producir resultados fiables. Entre las reglas recogidas en la citada norma, hay que resaltar las actividades de Control de Calidad como un requerimiento técnico esencial para el aseguramiento de la calidad de los resultados analíticos (Herrador, 2016) y que, como se muestra en la Figura 2, para que se alcancen dichos resultados se requiere que el laboratorio tenga implantado un sistema de garantía de calidad y que se haya certificado su competencia.

Dentro de las actividades de control de calidad que propone el estándar internacional ISO/ICE 17025 (ISO 17025, 2015), viene recogido el someterse a ensayos interlaboratorio, lo cual trae consigo la consecución de la certificación o la acreditación del

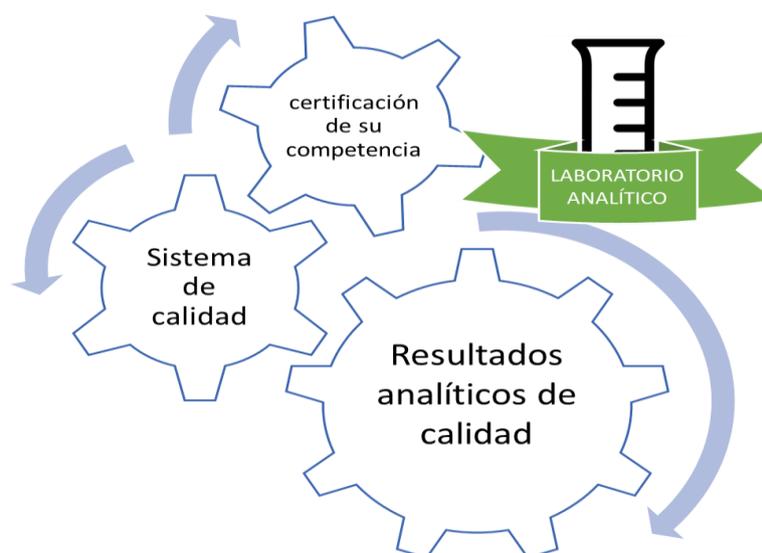


Figura 2.- Engranaje de los sistemas de calidad en los laboratorios analíticos

laboratorio; generalmente a través de un ensayo de aptitud y supone, en caso de superarse, un reconocimiento externo de la competencia técnica del laboratorio.

Los ensayos de aptitud, por tanto, evalúan de manera directa la exactitud y la precisión de los participantes, así como el correcto funcionamiento de los laboratorios, convirtiéndose en una herramienta de certificación y demostrando, de esta manera, la calidad en la producción de resultados en los laboratorios analíticos.

1.3. Calidad del método analítico

El método es el camino, la secuencia de operaciones técnicas específicas para llevar a cabo un determinado análisis químico (Cuadros y cols., 2013), suele ser un proceso complejo, con varias etapas, que comienza con el muestreo y finaliza con la generación de resultados (Taverniers y cols., 2004a) y debe estar totalmente adaptado al propósito del análisis. Dentro de los trabajos desarrollados por los laboratorios analíticos se incluye la validación de los métodos analíticos como una actividad necesaria.

Los métodos analíticos se caracterizan por una serie de propiedades llamadas “parámetros de calidad” que son las que se evalúan durante el proceso de validación. La definición de validación que la norma ISO/ICE 17025 (ISO 17025, 2015) establece en su cláusula 5.4.5.1. es muy objetiva: “Confirmación, a través del examen y el aporte de evidencias objetivas, de que se cumplen los requisitos particulares para un uso específico previsto”. Similarmente, el Vocabulario Internacional de Metrología (VIM, 2012) la define como la “verificación de que los requisitos especificados son adecuados para su uso previsto”. En pocas palabras, la validación de un método analítico implica demostrar que dicho método “funciona” (Herrador, 2016).

En el proceso de validación del método está implícito que los estudios para determinar los parámetros del desempeño del mismo se realizan usando equipos dentro de especificaciones, que están calibrados y que trabajan correctamente. Asimismo, el operador que realiza los estudios debe ser técnicamente competente en el campo de trabajo bajo estudio y debe poseer suficiente conocimiento sobre el trabajo a realizar

con el fin de que sea capaz de tomar decisiones apropiadas a partir de las observaciones hechas mientras avanza el estudio (de Bievre y cols., 1998).

Entre las razones que justifican la validación de los métodos analíticos están: demostrar que los métodos son adecuados a los análisis propuestos; trabajar con métodos que ofrezcan confianza y seguridad en los resultados, cumplir con las exigencias legales además de que la validación es un requisito previo en los procesos de transferencia de métodos analíticos y en la acreditación de laboratorios. Todo ello se va a ver reflejado en un incremento en la fiabilidad en los resultados generados por el laboratorio y en la confianza de los clientes en el mismo (Herrador, 2016).

Se pueden considerar dos tipos de validación: interna y externa. En la interna, el proceso se circunscribe al ámbito de un único laboratorio (intra-laboratorio). Se aplica en el caso de desarrollo de métodos nuevos o de modificaciones de métodos existentes y puede que no sea reconocida por otras entidades o laboratorios. En la externa, el proceso se lleva a cabo por un grupo de laboratorios (inter-laboratorio) mediante un ensayo de tipo colaborativo. Se aplica cuando un método candidato va a tener un uso o interés globalizado porque se pretende establecer como método de referencia. Implica un seguimiento estricto del protocolo del estudio y tienen un coste elevado (Herrador, 2016).

En la práctica, y como se comentó anteriormente, la validación del método se realiza evaluando una serie de características de funcionamiento, o parámetros de calidad, del método. Concretamente, en análisis farmacéutico, las exigencias de validación, incluyen (Figura 3) estudios de: Selectividad y Especificidad, Linealidad e Intervalo Lineal, Sensibilidad (Límites de Detección y Cuantificación), Exactitud (Precisión y Veracidad) y Robustez, que son los parámetros normalmente incluidos en el protocolo de validación. (Rambla y cols., 2012).



Figura 3.- Parámetros de calidad que hay que evaluar en la validación de un método analítico

Se entiende por Exactitud de un resultado el grado de proximidad entre el valor de referencia aceptado como verdadero y el valor encontrado en el ensayo. Este término supone la combinación de dos parámetros: la Veracidad, que tiene en cuenta los errores sistemáticos, y la Precisión, que hace lo propio con los errores aleatorios. Ambos parámetros son los criterios de validación más importantes y los que se evalúan en los ensayos inter-laboratorio, que se describirán más adelante (Rambla y cols., 2012). Lo que implicaría llevar a cabo una validación externa, mediante un ensayo colaborativo, y aunque esto sería lo ideal, no siempre es posible, por el coste y el esfuerzo que supone.

1.4. Calidad del material de referencia

Por Material de Referencia (MR) se entiende aquel material o sustancia que posee los valores de una o más propiedades suficientemente homogéneos y bien conocidos, que permiten su empleo para la calibración de aparatos, la evaluación de un método de medición o la atribución de valores a otros materiales (Guía ISO 30, 2015).

Siendo el Material de Referencia Certificado (MRC) todo material de referencia acompañado de un certificado, (documento que contiene toda la información esencial para la utilización de dicho MRC), emitido por un organismo autorizado que proporciona uno o varios valores de propiedades especificadas, con incertidumbres y trazabilidades asociadas, empleando procedimientos válidos (Cuadros y cols., 2013), lo que permite su uso para comprobar la exactitud de los resultados, calibrar instrumentos y equipos, validar métodos analíticos, comprobar la equivalencia de métodos de análisis, detectar errores al aplicar métodos normalizados, realizar control de procesos o asignar valores a un material o sistema. Los MRC son considerados como una herramienta muy útil para alcanzar la trazabilidad, calibrar equipos y métodos, monitorizar la actuación del laboratorio, validar métodos y permitir la comparación entre métodos (Taverniers y cols., 2004b). En la Figura 4 se muestra un ejemplo de un resumen de un documento de certificación que acompaña al producto BCR[®]-178 desarrollado por el IRMM, (JRC, 2017).

CALCIUM AMMONIUM NITRATE FERTILISER			
	Mass fraction		Number of accepted sets of results p
	Certified value ¹⁾ [mg/g]	Uncertainty ²⁾ [mg/g]	
ammoniacal-N	130.44	0.32	11
nitrate-N	130.15	0.57	10
total N	260.19	0.54	12
Ca	88.82	0.27	12

¹⁾ Unweighted mean value of the means of p sets of data, each being obtained in a different laboratory and/or with a different method. The certified value is traceable to the SI.

²⁾ Half-width of the 95 % confidence interval. The 95 % confidence interval is a measure of the uncertainty and is applicable when the reference material is used for calibration purposes.

When the reference material is used to assess the performance of a method, the user should refer to the recommendations laid down in the last chapter (instructions for use) of the certification report.

Figura 4.- Resumen de certificación de nitrato de calcio y amonio en un fertilizante

La principal diferencia entre un MR y un MRC es el certificado asociado al MRC emitido por un organismo competente, y para la obtención de este el estudio de certificación se deben garantizar unas propiedades, de las que destacan:

1. *Trazabilidad metrológica*: propiedad de un resultado por la cual el resultado puede relacionarse con una referencia mediante una cadena ininterrumpida y documentada de calibraciones, cada una de las cuales contribuye a la incertidumbre de medida (VIM, 2012).
2. *Homogeneidad*: requisito indispensable, significa que un MRC ha de presentar el mismo valor de la propiedad certificada dentro de una misma unidad y entre todas las unidades del MRC.
3. *Estabilidad*: el MRC debe ser estable durante las condiciones de envío, y el usuario debe conocer durante cuánto tiempo permanece estable el desde su recepción y desde que se abre el recipiente (ISO 33, 2000). La estabilidad tiene que referirse tanto a las propiedades certificadas como a la matriz. Algunos MRC pueden verse afectados por factores como la luz, la temperatura o la exposición a la atmósfera, por lo que el fabricante deberá indicar las condiciones de

transporte, manejo y almacenamiento recomendadas para el mismo (ISO 31, 2000).

4. *Incertidumbre*. Los valores certificados de la propiedad deseada en el MRC deben ir acompañados por sus valores de incertidumbre.

La certificación de un MR implica que los mejores métodos y analistas bajo las más estrictas condiciones de trabajo han conducido a la asignación de un valor a una sustancia en un determinado material. Cualquier error en el proceso de certificación confundirá a toda la comunidad analítica que la use de ahí la enorme importancia de adquirir MRC fiables, provistos por un proveedor competente (Herrador, 2016).

Los dos principales organismos internacionales de prestigio que producen, certifican y comercializan materiales de referencia certificados (Figura 5) son el Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST, por sus siglas en inglés, *National Institute of Standards and Technology*), (NIST, 2017) que opera en Estados Unidos, y el Instituto de Materiales de Referencia y Medidas (IRMM, por sus siglas en inglés, *Institute for Reference Materials and Measurements*) del *Joint Research Centre* europeo, (JRC, 2017) en la Unión Europea. Siendo el Código de Materiales de Referencia (COMAR), (COMAR, 2017), la principal base de datos para consultar su disponibilidad.



Figura 5.- Principales aplicaciones y organismos de certificación de MRC

2. OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo de fin de grado es poner de manifiesto la importancia que tienen los ejercicios inter-laboratorio en el control y evaluación externa de la calidad de los laboratorios analíticos y su contribución decisiva en el aseguramiento de la calidad de los resultados analíticos.

Este objetivo principal se alcanzará mediante la consecución de los siguientes objetivos parciales:

- Describir los ensayos de aptitud, estableciendo sus objetivos y características concretas, así como el tratamiento estadístico, la evaluación final de los resultados y la forma de implementarlos y su importancia trascendental para la acreditación de los laboratorios analíticos.
- Explicar la metodología a seguir en los ensayos colaborativos, destacando el tratamiento estadístico de los resultados y el papel que juegan estos ensayos en el establecimiento de métodos oficiales o de referencia.
- Exponer la metodología a seguir con los ensayos de certificación resaltando la importancia metrológica de la certificación de los materiales de referencia que es el propósito de los mismos.
- Ilustrar el empleo de estos ejercicios de intercomparación con algún ejemplo de interés en farmacia.
- Comentar finalmente la evolución de estos ensayos y su importancia en áreas de interés farmacéutico.

3. METODOLOGÍA

La realización de este trabajo, al ser de carácter bibliográfico, se ha podido llevar a cabo gracias a la utilización de diferentes fuentes de información como bases de datos, libros,

artículos científicos, tesis doctorales o informes y guías científicas. Según la parte del trabajo, cabe destacar unos u otros en concreto.

En primer lugar, se realizaron búsquedas en las bases de datos de la Universidad de Sevilla *Fama+* y en *PubMed* utilizando como palabras clave “calidad” y “control de calidad”, “Materiales de referencia certificados” o “método analítico” a partir de las cuales se obtuvo numerosa bibliografía de los primeros epígrafes.

Los libros Valcárcel, M. y Ríos, A. “La calidad en los laboratorios analíticos” y C. Miller, J.N. Miller.” Estadística para química analítica.” Han sido las guías a partir de las cuales se ha ido construyendo la introducción y los aspectos más generales del trabajo, ya que son obras de carácter global sobre la calidad en los laboratorios analíticos, en las que se abordan la práctica totalidad de los aspectos que hay que tener en cuenta para implantar los sistemas de calidad y validarlos externamente.

Esta información se ha ido completando con información adicional más específica tomada de numerosos artículos que forman parte de la base de datos llamada *PubMed*, a partir de palabras clave como “Interlab studies”, “Proficiency Testing”, “Collaborative studies”, “Certification Study”, “Certified Reference material”, se obtuvieron las diferentes fuentes de información bibliográfica.

Tras la lectura del título de los artículos encontrados en cada una de las búsquedas se hizo una primera selección, descartándose los que no estaban relacionados con el trabajo. Para la siguiente selección se procedió a la lectura del resumen de los mismos, hasta recopilar una serie de artículos con información interesante para el desarrollo de los objetivos. En una última selección se profundizó en la lectura, incluyendo artículos de relevancia.

Los criterios de exclusión principales a la hora de seleccionar la información fueron la restricción de cualquier documento del que no se dispusiera de forma completa, el criterio personal para determinar qué textos no tenían relación con los objetivos perseguidos por el trabajo, y los textos encontrados en la web cuya procedencia era poco fiable, desconocida o sin referencias bibliográficas.

Por último, también han sido fuente de documentación la Guía de Laboratorio para la validación de métodos y temas Relacionados desarrollada por Eurachem y diferentes protocolos como ISO 17043:2010, ISO 17025:2015, Guía ISO 30:2015 o ISO Guide 35:2017, entre otros.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Ejercicios Inter-laboratorio

4.1.1. Generalidades

Los ejercicios de inter-laboratorio se pueden definir como aquellos procesos analíticos realizados sobre una misma muestra, de forma independiente, por diversos laboratorios bajo la coordinación de una organización con condiciones documentadas, con objeto de tener un control de calidad en su trabajo, evaluar un método o determinar alguna propiedad de un material.



Figura 6.-Esquemas de los tipos de Ejercicios y su finalidad simplificada

En la Figura 6 se esquematiza los tres tipos principales de ejercicios, estudios o ensayos inter-laboratorio. Los tipos de evaluación de estudios inter-laboratorio pueden ser caracterizados paralelamente, según su propia definición, dependiendo de cuál de los tres factores primarios (métodos, laboratorios y materiales) permanece constante. Este criterio de denominación se recomienda como sustitución al conglomerado de designaciones corrientemente en uso. Los términos propuestos por la *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC), (IUPAC, 1994) son:

-Estudio de desempeño de un método: en el que se evalúan las características (actuación, conducta, cumplimiento, comportamiento) de un método de análisis. Se correspondería con los Ensayos Colaborativos de la Figura 6.

-Estudio de desempeño de un laboratorio: en el que se evalúan las características de actuación de un laboratorio/s o analista/s. Se correspondería con los Ensayos de Aptitud de la Figura 6.

-Estudio de certificación de un material: en el que se asigna el valor más probable (cantidad o concentración) de un componente en un determinado material, con una incertidumbre declarada. Se correspondería con los Ensayos de Certificación de la Figura 6.

Una vez elegido el tipo de ejercicio inter-laboratorio, la organización responsable debe planificarlo siguiendo un diseño general, con una serie de etapas secuenciales, que se esquematizan en la Figura 7. Todas las etapas, a excepción del análisis de la muestra que es labor de cada laboratorio participante, corren a cargo de la entidad organizadora desde el establecimiento de los objetivos del ejercicio hasta la discusión de los resultados y la elaboración del informe final.

Por su parte, los laboratorios participantes deben comprometerse a seguir fielmente todas las instrucciones y directrices pertinentes establecidas por la entidad organizadora.



Figura 7.- Etapas generales de la realización de un ejercicio de intercomparación:
(A) Entidad organizadora, (B) Laboratorio participante

Seguidamente se describirán cada uno de los tres ejercicios o ensayos inter-laboratorio y se comentarán algunas peculiaridades del esquema general inherente a cada tipo de ejercicio.

4.1.2. Ensayos de Aptitud

Es un tipo de ejercicio de inter-laboratorio cuyo objetivo es la evaluar el desempeño o funcionamiento del laboratorio. El número de laboratorios que participan lo determina la entidad organizadora del ensayo. La participación es libre ya que se trata de ensayos que, por norma general, son abiertos, posibilitando la participación a todos los interesados, sea cual sea la experiencia de estos, a excepción de los laboratorios acreditados que deben participar, obligatoriamente, en ensayos de aptitud para poder mantener su acreditación.

Van a consistir en analizar una muestra de composición conocida por el organizador, que distribuye entre los laboratorios participantes. Los laboratorios la analizan por el método que ellos elijan, que suele ser su metodología de rutina, y envían el resultado al

organizador, que se encarga de su tratamiento estadístico. De esta manera, se evalúa la capacidad que tienen los laboratorios participantes para generar resultados con un nivel aceptable de competencia con el método analítico que elijan.

La evaluación de los resultados, en este tipo de ejercicios, es muy sencilla y comienza calculando cuanto se aleja el valor proporcionado por el laboratorio del valor referencia que conoce la organización (μ) junto con su desviación estándar (σ) a través del valor de

Z-score, cuya expresión matemática es: $Z_i = \frac{X_i - \mu}{\sigma}$.

Los valores de μ y de σ utilizados pueden ser fijados a priori por acuerdo de los participantes, basándose en expectativas de desempeño. También pueden ser estimado a partir de resultados del inter-laboratorio luego de eliminar los datos discordantes o fijarlo en base a métodos robustos para cada combinación de analito, material y ejercicio.

Los valores de Z-score obtenidos se ordenan de mayor a menor (o al revés) y se representan frente al código del laboratorio obteniéndose gráficos del tipo que se muestra en la Figura 8, donde también se recogen los criterios de aceptación.

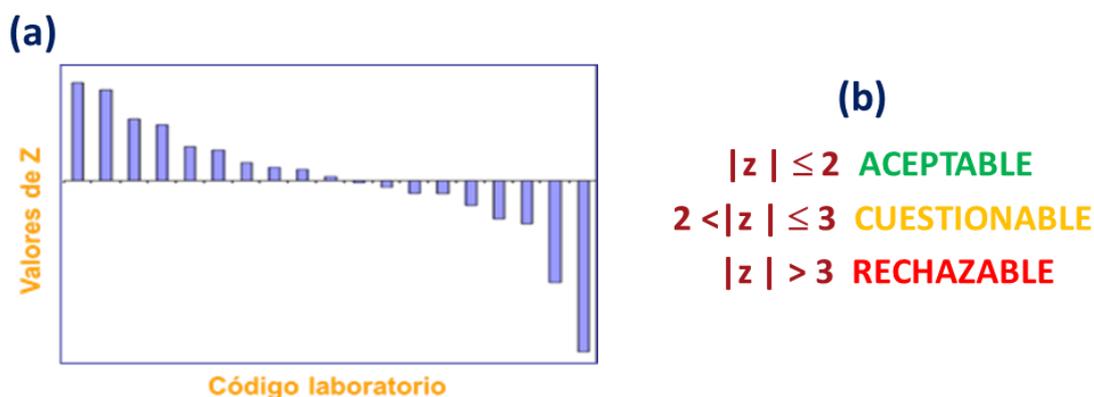


Figura 8.- Ejemplo de representación de puntuaciones Z-score (a) y de los criterios de aceptación (b) para los ensayos de aptitud

Si los laboratorios participan analizando más de un parámetro es posible la agrupación de varias puntuaciones del mismo laboratorio trabajando a partir de la “Z-score” de cada medida. Se puede trabajar con las sumas de cada valor ($SZ = \sum Z_i$); con las sumas de los

valores relativos ($RSZ = \sum Z_i/\sqrt{m}$) o con la suma de los cuadrados ($SSZ = \sum Z_i^2$), (Compañó y Rios, 2002).

Los valores de SZ y RSZ se obtienen cuando cada laboratorio participante ha obtenido un conjunto de evaluaciones de desempeño para una única combinación de analito, matriz y método analítico, (Thompson y cols., 2006). Su interpretación es idéntica a la Z-score.

Por su parte, el estadístico SSZ tiene la ventaja de evitar la anulación de Z-scores de signos opuestos, como en los dos casos anteriores, pero es menos sensible en la detección de pequeñas tendencias o sesgos. La interpretación de este estadístico se realiza por comparación del valor SSZ (estadístico de prueba) con el valor tabulado para un determinado número "m" de datos evaluados. En la Figura 9 se muestran estos valores, así como sus criterios de aceptación. Sin embargo, es conveniente filtrar o eliminar aquellos Z-scores que sean datos discrepantes antes de incluirlos en el análisis de desempeño.

Por tanto, RSZ es sensible a la presencia de sesgo o tendencias, el SSZ es sensible a la presencia de outliers.

(a) Valores tabulados de la distribución de χ^2					
m	A	B	m	A	B
2	6,18	11,83	11	19,99	28,51
3	8,02	14,16	12	21,35	30,10
4	9,72	16,25	13	22,70	31,66
5	11,31	18,21	14	24,03	33,20
6	12,85	20,06	15	25,35	34,71
7	14,34	21,85	16	26,66	36,22
8	15,79	23,57	17	27,96	37,70
9	17,21	25,26	18	29,25	39,17
10	18,61	26,90	19	30,53	40,63
			20	31,80	42,08

(b)	
$SSZ \leq A_{TAB.}$	ACEPTABLE
$A_{TAB.} < SSZ \leq B_{TAB.}$	CUESTIONABLE
$SSZ > B_{TAB.}$	RECHAZABLE

Figura 9.- Valores tabulados **(a)** y criterios de aceptación **(b)** para los valores de SSZ

La interpretación de los valores de SRZ es semejante a la del Z individual, es decir, en análisis satisfactorio, estos valores deberían presentar una distribución normal, con un

valor medio de cero y una desviación estándar unitaria. La mayoría de los resultados deberían tener valores absolutos de Z menores que 2.

Los ensayos de aptitud por tanto evalúan de manera directa la exactitud y la precisión de los participantes, así como el correcto funcionamiento de los laboratorios, convirtiéndose en una herramienta de reconocimiento. Sin embargo, no puede usarse como sustituto del control de calidad rutinario (intralaboratorio). No es, de manera aislada, un medio suficiente para validar métodos analíticos, ni para entrenar analistas individuales. Por otro lado, el éxito en una prueba de competencia para un analito no indica que un laboratorio sea igualmente competente para determinar un analito no relacionado (Thompson y cols., 2006).

Debido a la importancia de someterse a estos ensayos y al común uso de ellos, en el año 2000 se creó una base de datos llamada "EPTIS" (*European Information System on Proficiency Testing Schemes*) (IAAC, 2017), que actualmente dispone de un registro de más de 800 programas, estando abierto a cualquier proveedor de ensayos de aptitud que quiera incluir sus programas en el banco de datos, siempre y cuando el programa esté operando regularmente.

En España para elaborar un ensayo de aptitud hay definido un protocolo: UNE-EN ISO/IEC 17043:2010. Evaluación de la conformidad. Requisitos generales para los Ensayos de Aptitud. Elaborado por Asociación Española de Normalización y Certificación (AENOR), (ISO 17043, 2010).

4.1.3. Ensayos Colaborativos

Los ensayos de colaboración, o de desempeño de un método, son un tipo de estudio inter-laboratorio en el cual todos los laboratorios siguen el mismo protocolo escrito para medir una cantidad/concentración de un determinado componente en porciones de muestras idénticas. El informe de los resultados se usa para estimar las características de desempeño del método. Normalmente, estas características son la precisión intra e

inter laboratorio, y cuando es necesario y posible, otras características pertinentes tales como error sistemático, recuperación, parámetros de control de calidad internos, sensibilidad entre otras (IUPAC, 1994).

El número de laboratorios que participan lo determina la entidad organizadora del ensayo, este no debería ser demasiado pequeño, ya que los resultados tendrían escasa aplicación general, siendo 5 el mínimo y 8 o más los recomendados. Tienen que participar laboratorios expertos y que estén familiarizados con el método objeto de estudio que analizarán las muestras, de acuerdo a las instrucciones de la entidad organizadora, y devolverán sus resultados al centro de arbitraje (Miller y Miller, 2002).

La entidad organizadora estimará los valores medios y desviaciones estándar de cada laboratorio y procederá seguidamente a la eliminación de los valores anómalos siguiendo el esquema que se muestra en la Figura 10, (Compañó y Rios, 2002).

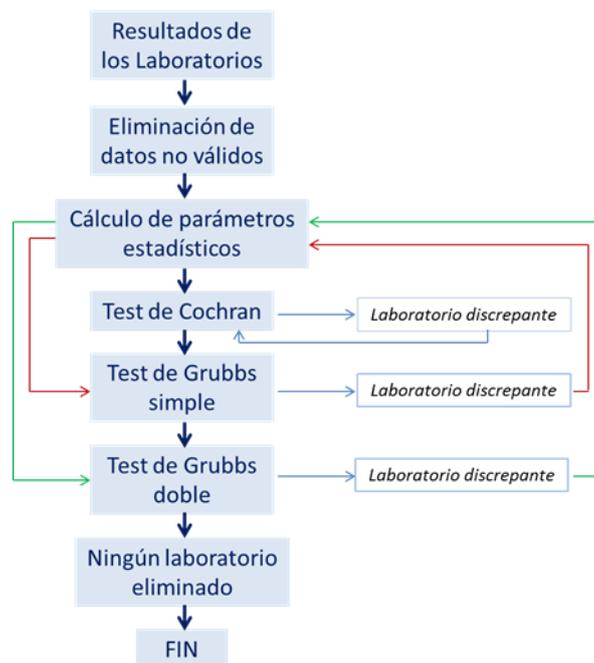


Figura 10.- Diagrama para eliminación de laboratorios que proporcionan resultados discrepantes

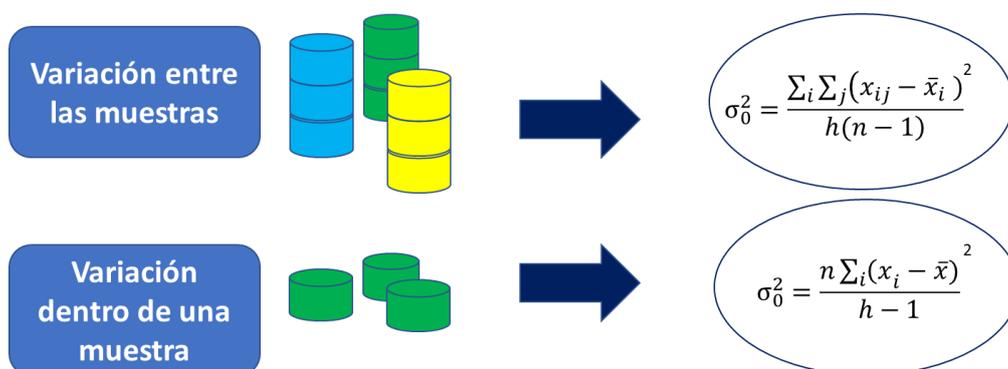
Para que un laboratorio no sea eliminado debe superar una serie de ensayos o test (en la Tabla 1 se resumen sus principales características) que miden la dispersión y centralización de los datos proporcionados.

Tabla 1.- Expresiones matemáticas y aplicaciones de los diferentes ensayos

Test de Cochran	Test de Grubbs Simple	Test de Grubbs Doble	Test de Grubbs Doble
$C = \frac{s_{\max}^2}{\sum_i s_i^2}$	$G1 = \frac{ \bar{x} - x_i }{s}$	$G2 = \frac{x_n - x_1}{s}$	$G3 = 1 - \left[\frac{(n-3)s_{n-2}^2}{(n-1)s^2} \right]$
Dispersión	Centralización		
	Un valor extremo	Dos valores sospechosos en extremos opuestos	Dos valores sospechosos vecinos

Los resultados de los laboratorios que no han sido eliminados se someten a un tratamiento estadístico, normalmente, se realiza un análisis de la varianza (ANOVA, de sus siglas en inglés, *Analysis of variance*) que sirve para separar y estimar las diferentes causas de variación. Ya sean debidas al error aleatorio o al método de análisis empleado, con esta técnica se verifica si la diferencia entre las medidas muestrales es demasiado grande para explicarse por medio del error aleatorio (Miller y Miller, 1993).

Para ello se calcula a través de las formulas de la figura 11 las varianzas que existen entre los análisis de las distintas muestras y las existentes dentro de los análisis de una muestra.

**Figura 11.- Fórmulas matemáticas para las varianzas de ANOVA**

Si el método no se encuentra sujeto a errores sistemáticos estas dos variaciones de σ_0^2 no deberían diferir de forma significativa, siendo la diferencia entre ellas el error aleatorio. (Miller y Miller, 1993).

En este tipo de ejercicios, además del ANOVA, que es el método usado cuando se realizan replicaciones en cada laboratorio, se puede utilizar otra aproximación llamada "SPLIT-LEVEL" en la que a los laboratorios participantes se les envían dos muestras (X e Y) que difieren ligeramente en composición y concentración, y estos las analizan sin hacer replicaciones (AOAC, 1989). Los resultados de los laboratorios pueden representarse de acuerdo con el procedimiento de las dos muestras de Youden (Youden, 1959).

Cada laboratorio se representa en un diagrama según sus coordenadas (X,Y) que son los resultados obtenidos para las dos muestras recibidas. Los valores medios de X y de Y constituyen el "centroide" que se toma como referencia para trazar dos líneas perpendiculares que dividen el gráfico en cuatro cuadrantes.

La longitud de la perpendicular desde un punto cualquiera a la diagonal, da una medida del error aleatorio y la distancia desde ese punto de corte al centroide se relaciona con la magnitud del error sistemático; el error total equivale a la distancia entre el centroide y el punto correspondiente a ese laboratorio (Figura 12a).

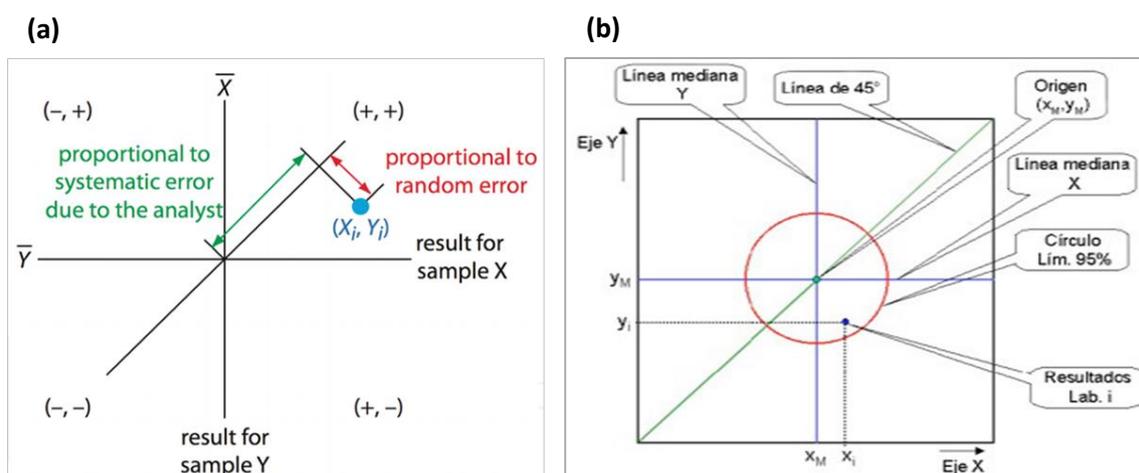


Figura 12.- Estimación de los errores **(a)** y del círculo de confianza **(b)** en el gráfico de Youden

El centroide también se emplea como referencia para trazar el círculo de confianza, del 95% generalmente. Los laboratorios que producen resultados de calidad caen dentro de este círculo de confianza y fuera del mismo se encuentra los laboratorios cuyos resultados están segados (Figura 12b) (Agulla y cols., 2008).

La varianza debida al error aleatorio puro se puede estimar como la diferencia entre las dos medidas $D = X_i - Y_i$. Análogamente, la varianza debida al error total se puede estimar si se calculan las sumas $T = X_i + Y_i$. De manera análoga al ANOVA, se puede comprobar con el ensayo F de una cola ($F > F_{95, l-1, l-1}$) si S_T^2 es significativamente mayor que S_D^2 y por lo tanto el sesgo del laboratorio (error sistemático) es importante. En la Tabla 2 se recogen las expresiones matemáticas para el cálculo de las varianzas debidas a los errores aleatorio, total y sistemático.

Tabla 2.- Expresiones matemáticas para la estimación de las distintas varianzas y F_{exp} .

Varianza Error aleatorio	Varianza Error total	Varianza Error sistemático
$S_D^2 = \frac{\sum (D_i - D_{mean})^2}{2(l-1)}$	$S_T^2 = \frac{\sum (T_i - T_{mean})^2}{2(l-1)}$	$S_L^2 = \frac{S_T^2 - S_D^2}{2}$
l : Número de laboratorios 2: por usar dos valores que se suman o restan para dar D ó T		$F_{exp} = S_T^2/S_D^2$

La representación de las dos muestras de Youden se usa para identificar laboratorios con errores sistemáticos y/o aleatorios especialmente elevados.

4.1.4. Estudios de Certificación

Tipo de ejercicio inter-laboratorio cuyo objetivo es asignar un valor de referencia (valor verdadero) a una cantidad (concentración o propiedad) en el material ensayado, normalmente con una incertidumbre declarada (IUPAC, 1994).

El número de laboratorios que deben participar es variable y solo podrán hacerlo los laboratorios experimentados y acreditados para esta labor, el uso de métodos variados, avalados y primarios enriquecerá el ensayo y le aporta mayor validez.

En estos ensayos, en los que se cuantifica y certifica, la homogeneidad del producto, es imprescindible asegurar la evaluación de la estabilidad y la gestión de los riesgos asociados con posibles problemas de estabilidad relacionados con las propiedades de interés. Las entidades que certifican un material deben asegurar su valor y estabilidad en el tiempo (ISO 35, 2017). Mientras menor sea la concentración del analito en las muestras, mayor será el riesgo debido a la posible contaminación de las muestras. (Lichtenberg, 2006).

La trazabilidad metrológica es pieza fundamental. Los laboratorios participantes tienen que tener la capacidad de relacionar sus mediciones con patrones o estándares analíticos. La Guía ISO 35: 2017 proporciona principios estadísticos para ayudar en la comprensión y el desarrollo de métodos válidos para asignar valores a las propiedades de un material de referencia, incluida la evaluación de su incertidumbre asociada, y establecer su trazabilidad metrológica.

La entidad organizadora provee del material a certificar a los laboratorios participantes, estos realizarán las mediciones de las propiedades a certificar y remitirán sus resultados a la entidad organizadora quien realizará el correspondiente tratamiento estadístico de los mismo de manera similar a la descrita en el apartado anterior con la única salvedad de que al tratarse de réplicas de una misma muestra y no de medidas de dos muestras con concentraciones diferentes, no se puede usar el método de Youden.

4.1.5. Resumen comparativo de estos ejercicios

En la Tabla 3 se muestra un resumen comparativo de los tres tipos de ejercicios interlaboratorio atendiendo a diversos factores tales como el objeto de evaluación, el número de laboratorios y la experiencia de estos, el método analítico usado, la

confidencialidad, el requerimiento de trazabilidad, la expresión de los resultados o los protocolos usados.

El objeto de evaluación es el propio laboratorio participante, el método analítico o el material a certificar según el tipo de ejercicio. El número de laboratorios participantes no está especificado en los ensayos de aptitud ni de certificación, pero sí en los colaborativos. La confidencialidad adquiere mayor relevancia en los ensayos de aptitud, ya que en estos se juzga el desempeño y la calidad de los participantes. En los ensayos colaborativos el método será estrictamente protocolizado mientras que en los ensayos de aptitud cada laboratorio puede usar el método que emplea de forma rutinaria y en los estudios de certificación se deben emplear métodos independientes y en los que los laboratorios tengan experiencia. En cuanto a la metodología a seguir, cada tipo de ejercicio dispone de un protocolo establecido plasmado en su correspondiente norma ISO.

Tabla 3.- Resumen comparativo de los ejercicios inter-laboratorios descritos

TIPOS	Ensayos de Aptitud	Validación de métodos	Certificación de materiales
Evaluación	Desempeño del laboratorio	Desempeño del método analítico	Asignar un valor de referencia
Número laboratorios	No especificado	8 o más (mínimo 5)	No especificado
Experiencia laboratorios	Diferentes	Solo experimentados	Solo experimentados (acreditados)
Método analítico	Diferentes	Estrictamente específica	Variados (definitivos)
Confidencialidad	Significativa	Baja	Baja
Trazabilidad	No requerida	Requerida	Extremadamente importante
Resultado	$X, \sigma, (z)$	R, r	$X \rightarrow \mu$
Protocolo	ISO 17043:2010	ISO 5725-2	ISO Guide 35:2017

En los tres ensayos descritos cobra importancia la muestra distribuida a los distintos laboratorios: deben ser alícuotas estables y homogéneas. Su conservación y manipulación debe ser cautelosa y protocolizada si se desean obtener resultados representativos en el ensayo.

Es importante recalcar la importancia de la participación de los laboratorios en los Ensayos de Aptitud hecho que les permitirán corregir fallos y dar nuevos pasos hacia la consecución de la excelencia.

Dada la importancia por la gran responsabilidad que supone el posible uso futuro de un determinado método, objeto de estudio en los ejercicios de tipo colaborativo, como método estándar o de referencia y las connotaciones legales que pueda tener, hay que insistir en ajustarse, estrictamente, a la metodología usando procedimientos normalizados de trabajo para que todos los laboratorios lo lleven a cabo de la misma manera.

Del mismo modo, no menos importancia tendrá los estudios de certificación, ya que Los materiales de referencia (MR) se utilizan en todas las etapas del proceso de medición, incluyendo la validación del método, la calibración y el control de la calidad. También se utilizan en las comparaciones inter-laboratorio para la validación del método y para la evaluación de la aptitud del laboratorio. Hay que elegir laboratorios de excelencia, que empleen métodos variados y primarios y realizar un adecuado tratamiento de datos.

4.2. Ejemplos de sus aplicaciones

4.2.1. Determinación de cationes y aniones en agua

Para ejemplificar los ensayos de aptitud se ha contado con datos primarios obtenidos de un informe técnico del INTI (SAI, 2009). En este estudio se analizaron muestras de agua de una cooperativa que abastecía una red de distribución por los diversos laboratorios participantes que determinaron diferentes parámetros (cationes y aniones comunes en el agua) utilizando diferentes métodos. El objetivo de este ensayo es obtener una evidencia objetiva del desempeño de los laboratorios, posibilitando además la identificación de los posibles errores en los métodos a los participantes.

De todos los parámetros determinados se ha elegido el K^+ para ilustrar los cálculos de un Z-score sencillo y los resultados de: Cl^- , NO_3^- , SO_4^{2-} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ y Na^+ , para ilustrar

los Z-score combinados. Conociendo los valores consensuados para el valor verdadero (μ) y la desviación estándar (σ) en todos los casos, se procede a calcular los valores de Z-score y los Z combinados. Los resultados obtenidos aparecen en la Tabla 4.

Tabla 4.- Resultados de Z_k , RSZ y SSZ obtenidos en un Ensayo de Aptitud

Código Laboratorio	Ejemplo de cálculo de Z para el parámetro Potasio		Z combinados para diversos parámetros (Cl^- , NO_3^- , SO_4^{2-} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ y Na^+)	
	K^+ (mg/L)	Z_k	RSZ	SSZ
01 (A)	16,45	-0,63	-2,245	19,598
04 (B)	20,7	0,99	1,679	27,251
06 (C)	19	0,34	0,782	1,387
07 (D)	16	-0,8	2,484	69,906
08 (E)	17,1	-0,38	-0,628	1,685
09 (F)	17,9	-0,08	-0,154	2,101
10 (G)	18,8	0,27	-0,338	0,648
11 (H)	18,4	0,11	-0,375	1,051
13 (I)	17,9	-0,08	-1,211	6,755
14 (J)	19	0,34	0,806	2,393
15 (K)	11,5	-2,67	-2,877	23,29
18 (L)	17	-0,42	-0,882	1,533
21 (M)	17,7	-0,30	-0,632	2,169
23 (N)	18,72	0,24	-0,026	1,191
24 (Ñ)	16,6	-0,57	-2,9	18,258
26 (P)	19	0,38	0,041	0,391
28 (Q)	20,5	0,92	-0,651	6,834
29 (R)	21,58	1,33	0,596	3,655
35 (S)	18	-0,04	0,676	1,341
37 (T)	16,5	-0,61	-1,748	12,787
39 (U)	16	-0,8	-0,471	9,554
41 (V)	18,1	0	0,490	1,074
42 (W)	23,5	2,06	0,604	9,197

En la Figura 13a se representan (columnas 1 y 3 de la Tabla 4) los valores de Z_k obtenidos por los 23 laboratorios participantes y en la Figura 13b los valores combinados SSZ (columnas 1 y 5) para 19 laboratorios (exceptuando D, R, T y V, que no han analizado alguno de los 7 parámetros considerados).

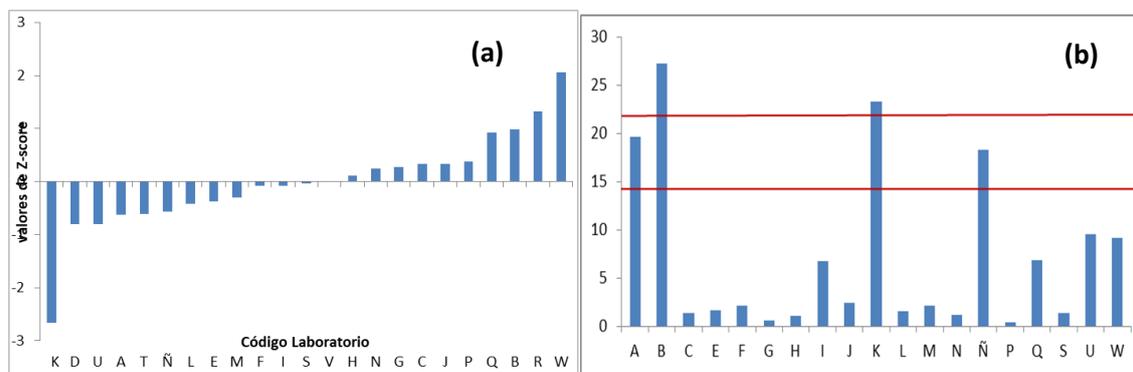


Figura 13.- Valores de Z_k (a) y SSZ (b) obtenidos por los laboratorios participantes

Se observa (Figura 13a) que todos los valores de Z_k , exceptuando los obtenidos por los laboratorios K y W, ambos Cuestionables, son Aceptables y que no hay ningún valor Rechazable. Los mejores laboratorios son los que obtienen valores de Z cercanos a 0 (F, I, S, V, H). También se pone de manifiesto que existe aproximadamente el mismo número de laboratorios que cometen errores por exceso que por defecto (valores de Z positivos o negativos, respectivamente).

En la Figura 13b se muestran los valores de SSZ asignados a los laboratorios junto con los valores tabulados de referencia ($A=14,34$ y $B=21,85$) representados por dos líneas rojas horizontales que marcan los límites tabulados (Figura 9) para $m=7$. Se observa que hay dos laboratorios, B y K, cuyos valores exceden el límite superior siendo, por tanto, Rechazables. Anteriormente se ha descrito como el laboratorio K tenía unos valores rechazables para el cálculo del potasio, también ocurre para el cálculo global de varios factores. Los laboratorios A y Ñ presentan resultados Cuestionables. Los laboratorios restantes, con valores por debajo del límite inferior, proporcionan, por tanto, resultados Aceptables. El laboratorio W, que obtenía resultados Rechazables para el potasio,

alcanza un resultado aceptable si se evalúa su actuación global en la determinación de los diversos parámetros.

En los informes y conclusiones finales emitidas por la entidad organizadora, se comunica confidencialmente a los distintos laboratorios participantes los resultados obtenidos en el Ensayo de Aptitud, a la vez que se les asesora e indican, en caso necesario, posibles actuaciones de mejora.

4.2.2. Determinación de proteínas en harina

Para ejemplificar el método matemático ANOVA en los estudios colaborativos se ha contado con datos originales recogidos de una publicación de Nelsen y Wehling (Nelsen y Wehling, 2008). En este estudio se ha intentado, sin éxito aparente, validar un método (Q1) para la obtención del porcentaje de proteína de la harina. Como ejemplo se elige la Harina A que tiene un porcentaje conocido, 10%, de proteínas y se analizan por duplicado (numerados como 9 y 4). Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5.- *Porcentaje de proteína de 10 muestras de harina de trigo analizadas por el método a validar*

Laboratorio	A(9)	A(4)
1	10,46	10,69
2	10,07	10,37
3	9,51	9,07
4	10,12	9,73
5	9,42	9,66
6	9,34	9,15
7	9,39	9,24
8	11	10,96
9	9,82	9,56
10	10,04	10,51
11	10,52	10,53
12	9,88	9,81
13	9,59	9,14
14	9,55	9,41
15	10,96	10,65

1.- Se aplican los test de C y G1, G2 y G3 (todos los cálculos han sido realizados en *Microsoft Excel*, a través del programa *Microsoft office profesional plus 2016*), siguiendo el esquema mostrado en el epígrafe 4.1.3. Resultado: no se elimina ningún laboratorio.

2.- Se realiza un ANOVA como resultado del cual (Figura 14) se obtiene un $F_{\text{experimental}} \gg F_{\text{tabulado}}$, lo cual indica que existen diferencias reales en el análisis de proteínas entre las réplicas.

ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	de cuadrada	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	9,67196667	14	0,690854762	17,0147302	1,03265E-06	2,424364357
Dentro de los grupos	0,60905	15	0,040603333			
Total	10,2810167	29				

Figura 14.- ANOVA en Microsoft Excel de los duplicados para la harina A

El cálculo del coeficiente de variación (RSD_R reproducibilidad) muestra un valor, 6,09, claramente superior al recomendado por la AOAC (AOAC, 1989) para el valor de concentración estudiada (10%).

Los datos obtenidos indican que el método no es fiable desde el punto de vista de la precisión interlaboratorio. En este punto, la comisión organizadora puede rechazar, o no recomendar, el método que se está ensayando (Q1) por considerarlo no fiable para propósitos de reproducibilidad. Se debe inspeccionar las causas de la falta de confianza y tratar de solucionarlas.

Además, los laboratorios 8 y 15 y 6 y 3 proporcionan valores consistentemente más altos y bajos respectivamente. Estos resultados muestran que el método tiene un sesgo sistemático. El método puede no ser invalidado si este sesgo es juzgado como trivial por el comité, aunque el desarrollador del método debería tratar de encontrar la fuente de este error y corregirla (Nelsen y Wehling, 2008).

4.2.3. Determinación de ácidos grasos poliinsaturados en grasas y aceites

Para ejemplificar el método matemático de Youden en los estudios colaborativos se ha contado con datos primarios obtenidos de “*Youden Two-Sample Method*” (Martín y cols., 2017). En el estudio se determinan los ácidos grasos poliinsaturados en grasas y aceites (PUFA). El procedimiento consiste en saponificar la muestra, tratarla con un enzima y medir la absorción del producto 234 nm. Porciones aleatorias de dos muestras similares fueron distribuidas a los laboratorios participantes que las analizaron usando el mismo método oficial de FDA. Los resultados obtenidos se indican en la Tabla 6.

Tabla 6.- Resultados obtenido por los laboratorios participantes para las dos muestras analizadas

Laboratorio	X	Y
1	26,1	28,5
2	24,7	24,8
3	29,2	26,8
4	29,5	26,9
5	28,2	32,3
6	27,5	25,9
7	25,8	26,9
8	30	28
9	29	25
10	8,2	26,3
11	31,3	32
12	29,6	28,6
13	24,3	25,9
14	31	31,3
15	30,3	30,8
16	31,8	29,9

Los resultados proporcionados por el laboratorio 10 se eliminan por diferir mucho entre ellos y tratarse, claramente, de resultados discrepantes. Con los datos restantes se calculan los valores de D y T y S_D y S_T que aparecen recogidos en la Tabla 7.

Tabla 7.- Valores D y T y S_D y S_T de los resultados obtenidos por los laboratorios

Laboratorio	X	Y	D	D - D_{media}	T	T - T_{media}
1	26,1	28,5	-2,4	-2,8	54,6	-2,2
2	24,7	24,8	-0,1	-0,5	49,5	-7,3
3	29,2	26,8	2,4	2,0	56	-0,8
4	29,5	26,9	2,6	2,2	56,4	-0,4
5	28,2	32,3	-4,1	-4,5	60,5	3,7
6	27,5	25,9	1,6	1,2	53,4	-3,4
7	25,8	26,9	-1,1	-1,5	52,7	-4,1
8	30	28	2,0	1,6	58	1,2
9	29	25	4,0	3,6	54	-2,8
11	31,3	32	-0,7	-1,1	63,3	6,5
12	29,6	28,6	1,0	0,6	58,2	1,4
13	24,3	25,9	-1,6	-2,0	50,2	-6,6
14	31	31,3	0,3	-0,1	62,3	5,5
15	30,3	30,8	-0,5	-0,9	61,1	4,3
16	31,8	29,9	1,9	1,5	61,7	4,9
	Media 28,55	Media 28,20	Media 0,4	Suma cuadrados 65,0	Media 56,8	Suma Cuadrados 270,8
				SD		ST
				1,52		3,11

Con los valores medios de X e Y se calcula el centroide (28,6; 28,2). A partir de los valores de S_D , S_T se calcula $F_{experimental}$ (4,186) lo que confirma la presencia de errores sistemáticos ya que el valor de $F_{tabulado}$ es de 2,484, al 95% de nivel de confianza. También se calcula el radio del círculo de confianza del 95% (3,72) y se traza el gráfico (Figura 15) los análisis estadísticos se realizaron con MedCalc © para Windows, versión 17.9 (MedCalc Software, Ostend, Bélgica).

Los Laboratorios 8 y 12 son los que presentan menor error y se sitúan más cerca del centroide. Los Laboratorios 2 y 13, 5 y 11 se sitúan fuera del círculo de confianza indicando altos errores totales a los que contribuyen tanto los errores sistemáticos como aleatorios. Si se eliminan estos laboratorios se recalculan los valores y se comprueba, valor de F, que no existen sesgo debido a los errores sistemáticos.

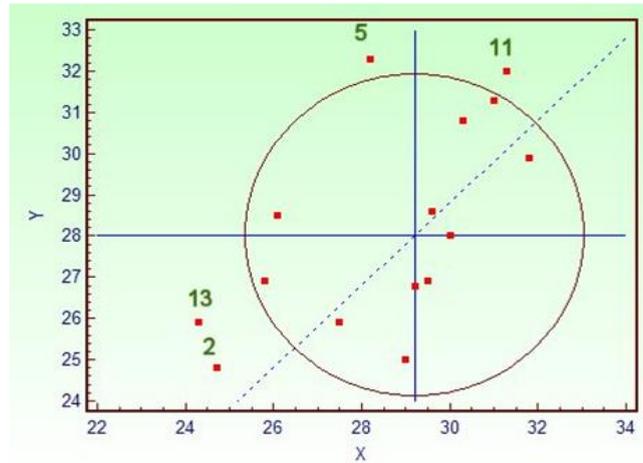


Figura 15.- Gráfico de Youden para los resultados de la Tabla 7

Si no hubiera variaciones sistemáticas entre los laboratorios, se esperaría que el patrón de puntos fuera circular. Cuanto mayores sean las variaciones sistemáticas, más elíptico se volverá el patrón.

4.2.4. Certificación de cipermetrina en té verde

Para ejemplificar los estudios de certificación se ha contado con datos obtenidos de una publicación "*Development of a candidate certified reference material of cypermethrin in green tea*" (Sin y cols., 2012). Los objetivos de este trabajo fueron describir la preparación y certificación de un candidato de MRC para la cipermetrina, insecticida que conduce a cambios permanentes en los parámetros bioquímicos, las actividades enzimáticas y los marcadores redox, (Ghorzi y cols., 2017). Para ello se eligió el té verde y el aspirante fue denominado (GLHK-11-01^a).

Se adquirió la materia prima, té verde, que contenía el insecticida en condiciones mínimas admitidas en el mercado local y se distribuyó a los laboratorios participantes después de ser tratada por una metodología común.

Tras el estudio previo para eliminación de resultados discrepante se concluye que no se debe eliminar ningún laboratorio. Los datos obtenidos para las concentraciones de

cipermetrina en el té por los laboratorios, vienen recogidos en la Figura 16 (Sin y cols., 2012).

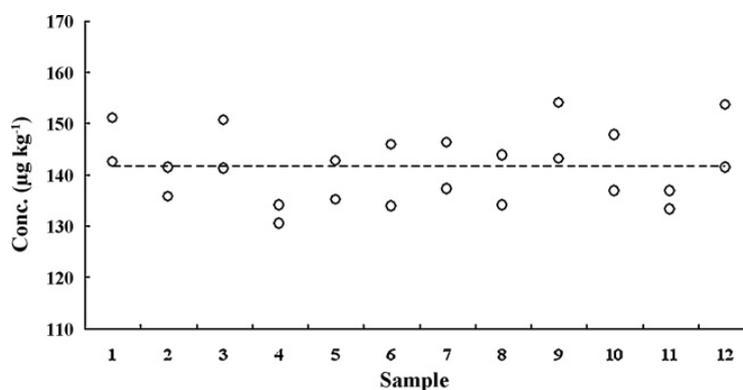


Figura 16.- Resultados del análisis duplicado de doce muestras aleatorias en la prueba de homogeneidad. La línea punteada representa el valor medio de la masa no seca.

La actuación de los laboratorios fue la de examinar la concentración a través de rectas calibrado obtenidas de los MRC ya documentados y el aspirante. La varianza entre muestras enviadas y la varianza dentro de las muestras se determinaron mediante ANOVA. Las relaciones entre las varianzas dentro de cada muestra, y entre las distintas muestras, fue de 1.26 menor que el valor crítico de 2,72 con un intervalo del 95% de confianza.

Por ANOVA se evaluó conjuntos de datos generados a partir de los dos métodos IDMS y no se identificó ninguna diferencia significativa ($F = 0,67 < F_{\text{critical}} = 3,0$ en el nivel de confianza del 95%, F es el valor del criterio de Fisher)

Por lo tanto, se concluye que el MRC propuesto es apto ya que no evidencia variaciones sistemáticas con el MRC avalado. La fracción de masa seca de la cipermetrina total se asignó a 148 g kg⁻¹ con una incertidumbre expandida relativa de $\pm 9,2\%$. Debido al número limitado de CRM de matriz disponible en el mercado para el análisis de plaguicidas, el material será útil para el trabajo de garantía de calidad para el análisis cuantitativo de cipermetrina y plaguicidas piretroides similares en té y otras matrices de alimentos de origen vegetal.

4.3. Cronología de los ejercicios inter-laboratorio y su interés en farmacia

La necesidad de obtener una garantía de calidad en el desarrollo de cualquier labor en un laboratorio es un tema de constante actualidad e innovación. La norma ISO 17025 exige explícitamente participar en ensayos de aptitud, usar MRC y métodos validados.

Atendiendo a todas las publicaciones emitidas en materia de ejercicios de inter-laboratorio, de la base de datos *PubMed*, se ha recopilado y clasificado en las tres tipologías expuestas en esta revisión: ensayos de aptitud, ensayos colaborativos y ensayos de certificación.

Para ello, como se aprecia en la Figura 17, se ha elaborado un gráfico de cada área en el que expresamos el número de publicaciones y las décadas en las que se publicaron, estrechándose el eje en lustros desde el 2000. Posteriormente, se ha elaborado una cronología principal objeto de debate, desde principios del vigente siglo, hasta octubre de 2017.

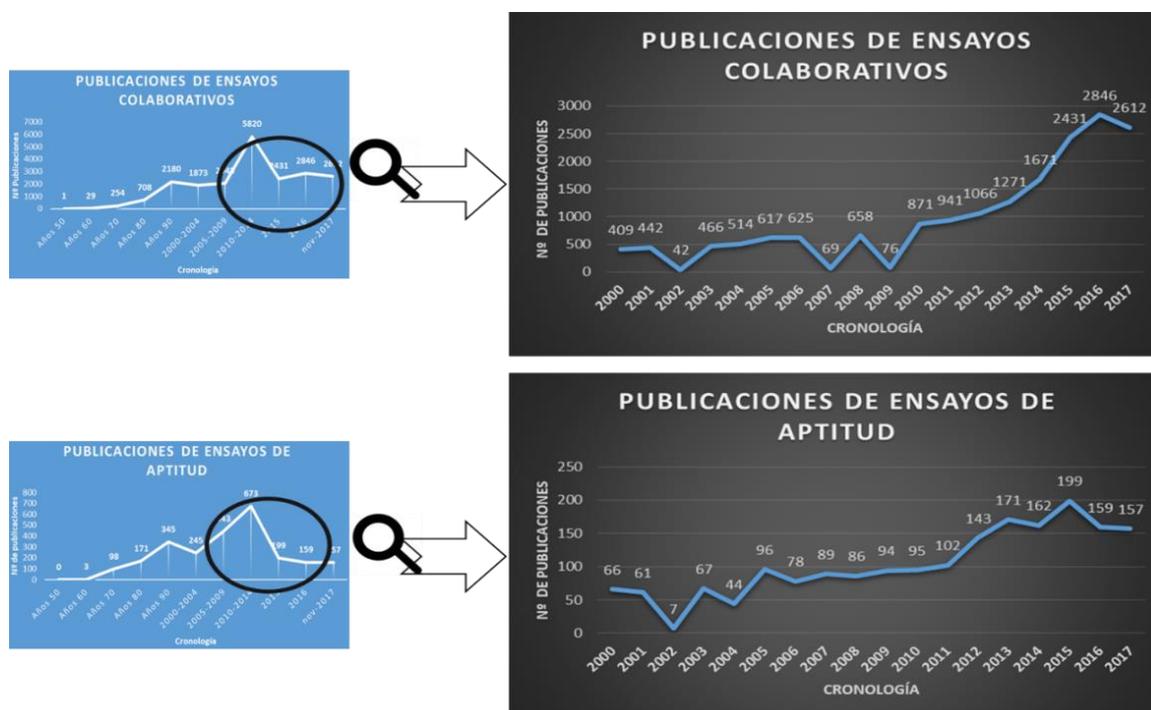


Figura 17.- Evolución cronológica del número de publicaciones de los Ensayos Colaborativos y de Aptitud

Los ensayos colaborativos publicados aparecen en 1950, algo más tardío fueron los ensayos de aptitud que datan de 1965, aunque no fue hasta la década de los 90 donde ambas evaluaciones despegaron en su número de publicaciones.

De manera similar se produjo en los estudios de certificación, como apreciamos en la Figura 18, se iniciaron en 1958 pero igualmente no fue hasta la década de los 90 donde se aprecia un aumento considerable en sus publicaciones.

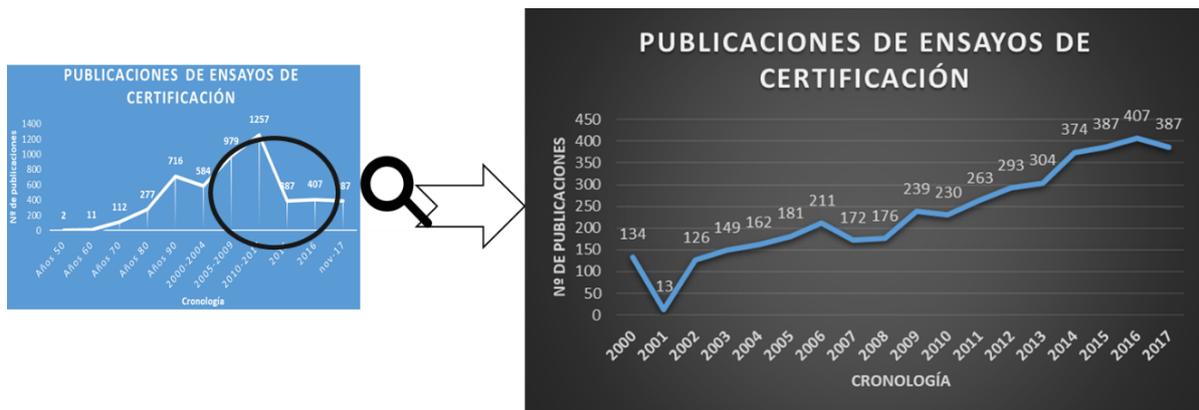


Figura 18.- Evolución cronológica del número de publicaciones de los Ensayos de Certificación

Desde principios de este siglo, se establece una línea creciente y estable de las tres tipologías descritas en las últimas figuras. Este aumento significativo cronológico, se puede relacionar con la necesidad y el empeño del logro de la calidad.

Sin embargo, hay que destacar que no todos los estudios inter-laboratorio que se realizan son objeto de publicación en revistas indexadas ya que no se trata de trabajos de investigación propiamente dicho, sino que se circunscriben dentro de los trabajos para la mejora, control y evaluación, y, en definitiva, el aseguramiento en la calidad de la información analítica. Los ensayos de aptitud, como ya se indicó, tienen un marcado carácter confidencial ya que clarifica y cuantifica la calidad de un laboratorio y no todos los participantes están dispuestos a mostrar unos malos resultados. Los estudios de certificación están, la mayoría de veces, ligados a organismos como el NIST o el IRMM, que utilizan sus estudios de manera privada y no siempre publican sus estudios. Los

ensayos colaborativos se circunscriben, a menudo, a un grupo de laboratorios que están interesados en validar un método concreto. Por tanto, muchos de estos resultados se recogen en forma de guías, documentos o informes de uso interno para determinados organismos o empresas y solamente se publica aquellos estudios que se consideren más novedosos o que tengan un interés especial por su impacto sanitario y/o medioambiental tal como se muestra en la Figura 19 en la que se recogen, a modo de ejemplo, los porcentajes de estas publicaciones en los últimos 5 años.

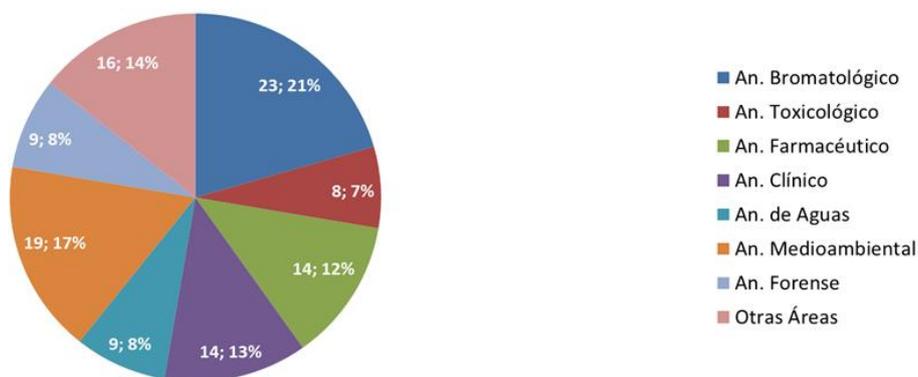


Figura 19.- Distribución de las publicaciones de ejercicios inter-laboratorio en diferentes áreas

Lo anteriormente expuesto dificulta la idea de cuantificar de manera precisa el aumento de estas técnicas de evaluación externa, no obstante, se puede afirmar con rotundidad que son una herramienta imprescindible, en auge en el último siglo, y con una tendencia al alza que continuará en los años venideros.

5. CONCLUSIONES

Se ha puesto de manifiesto la importancia que tienen los ejercicios interlaboratorio en el control y la evaluación externa de la calidad en los laboratorios analíticos. Demostrándose que la implantación de un sistema de calidad (intralaboratorio) no es suficiente, por sí sola, para garantizar unos resultados con la calidad requerida y para

que esta se mantenga a lo largo del tiempo. Deben, por tanto, instaurarse un control de calidad externo, objeto de esta revisión, que resulta decisivo en el aseguramiento de los resultados.

Se ha descrito los ensayos de aptitud, resaltando que su objetivo es la evaluar el desempeño o funcionamiento del laboratorio a través de su exactitud y precisión, y que esta labor culmina con la consecución de la acreditación de calidad a los laboratorios participantes.

Se ha explicado las posibles variables de la metodología en la que se basan los ensayos colaborativos, estableciendo que su consecuencia es la validación de los métodos analíticos, siendo esta la principal herramienta para establecer un método como oficial o de referencia.

Se ha expuesto la importancia metrológica de los ensayos de certificación de materiales de referencia, que es el propósito de los mismos. Dado que el error es inherente a la medida, resulta de vital importancia obtener unos valores seguros de incertidumbre en los materiales de referencia para el correcto funcionamiento de los laboratorios analíticos.

Seguidamente, se ha ilustrado el empleo de los ejercicios de intercomparación en todas sus modalidades con ejemplos de interés en el sector sanitario y farmacéutico. De esta manera, se ha comentado como siguen las metodologías descritas los sectores mencionados y la gran importancia que tienen estas herramientas para la consecución directa de sus objetivos.

Finalmente, comentamos que la corriente evolutiva que siguen estos ensayos desde sus primeras publicaciones, a mediados del siglo XX, ha tenido un constante aumento. En la última década, la importancia de la calidad en el laboratorio analítico cobra un estatus de condición *sine qua non*, que se traduce como un aumento exponencial de ejecución de esta práctica, presente con enorme importancia en todas las áreas sanitarias y farmacéuticas.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Agulla A, Filippini OS, Delfino H. Informe del sexto interlaboratorio de aguas superficiales potencialmente contaminadas. Argentina: Cámara argentina de laboratorios independientes bromatológicos, ambientales y afines (CALIBA); 2008.
- AOAC International. AOAC Official Methods of Analysis. Appendix D: Guidelines for Collaborative Study Procedures To Validate Characteristics of a Method of Analysis, J. AOAC Int. 1989; 72: 694 – 704.
- Bievre P. The Fitness for Purpose of Analytical Methods A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. 1ª ed. México; 1998.
- Bundesanstalt für Materialforschung und – prüfung (BAM). COMAR [en línea]. [Consultado noviembre 2017]. Disponible en:
<http://www.comar.bam.de>
- Compañó R, Ríos A. Garantía de la calidad en los laboratorios analíticos. 1ª ed. Madrid: Síntesis; 2002.
- Cuadros L, Gámiz L, Carrasco A, Ruiz C. Glosario de términos analíticos. 1ª ed. GRASEQA; 2013.
- Ghorzi H, Merzouk H, Hocine L, Merzouk SA. Long term biochemical changes in offspring of rats fed diet containing alpha-cypermethrin. Pestic Biochem Physiol. 2017; 142: 133 – 140.
- Herrador MA. La calidad del resultado analítico. 1ª ed. Sevilla: Academia Iberoamericana de Farmacia; 2016.
- Interamerican Accreditation Cooperation (IAAC). EPTIS [en línea]. [Consultado en noviembre 2017]. Disponible en:
<http://www.iaac.org.mx/Spanish/EPTIS.php>
- International Organization for Standardization (ISO). ISO / IEC 43:2010, Conformity assessment - General requirements for proficiency testing. 2010.
- International Organization for Standardization (ISO). ISO 5725 – 1, Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results. 1994.
- International Organization for Standardization (ISO). ISO Guide 31:2000, Reference materials. Contents of certificates and labels. 2000.
- International Organization for Standardization (ISO). ISO Guide 30:2015, Reference materials -- Selected terms and definitions. 2015.
- International Organization for Standardization (ISO). ISO Guide 33:2000, Uses of certified reference materials. 2000.

- International Organization for Standardization (ISO). ISO Guide 35:2006, Reference materials – General and statistical principles for certification. 2006.
- International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC). Nomenclature of interlaboratory analytical studies. *Pure & Appl. Chem.* 1994; 66 (9): 1903 – 1911.
- Joint Research Centre (JRC), EU Science Hub. The European Commission's science and knowledge service [en línea]. [Consultado en noviembre 2017]. Disponible en:
<https://ec.europa.eu/jrc/en>
- Kellner R, Mermer JM, Otto M, Widmer HM. *Analytical Chemistry*. 1ª ed. Weinheim: Wiley–VCH; 1998.
- Lichtenberg P. Preparación de un material de referencia certificado para la determinación de mercurio en músculo de pez Alfonsino (*beryx splendens* L. 1834). Trabajo de fin de carrera, universidad de Chile, facultad de ciencias químicas y farmacéuticas, departamento de ciencias y tecnología de los alimentos; 2006.
- Martín J, Velázquez N, Asuero A. Youden Two – Samples Method. En Kounis L, editor. *Quality Control and Assurance – An Ancient Greek Term Re –Mastered*. 1ª ed. Hertfordshire, UK: InTech; 2017.
- Miller JC, Miller JN. *Estadística para Química Analítica*. 2ª ed. Estados Unidos. Addison-Wesley Iberoamerican, S.A; 1993.
- Miller JN, Miller JC. *Estadística y Quimiometría para Química Analítica*. 4ª ed. Madrid. Prentice Hall; 2002.
- Nelsen T, Wehling P. Collaborative Studies for Quantitative Chemical Analytical Methods. *Cereal food world*. 2008; 53 (5); 285 – 288.
- National Institute of Standards and Technology (NIST). US Department of Commerce [en línea]. [Consultado Noviembre 2017]. Disponible en:
<https://www.nist.gov/>
- Rambla-Alegre M, Esteve-Romero J, Carda-Broch S. Is it really necessary to validate an analytical method or not? That is the question. *J Chromatogr A*. 2012; 1232: 101–109.
- Riu J, Maroto A, Boqué R, Rius FX. Determinación de la trazabilidad en medidas químicas. *Técnicas de laboratorio*. 2001; 261: 312 – 315.
- Rodríguez-Benavides G, Blanco-Sáenz R. Aseguramiento de la Calidad Analítica y Norma ISO 17 025 en Laboratorios Clínicos y Químicos. *Rev Costarric Cienc Méd*. 2001; 22 (1-2): 83 – 97.

- Servicio Argentino de Interlaboratorio (SAI). Ensayo Interlaboratorio "Aguas – Parámetros Básicos". Argentina: Instituto Nacional de Tecnología Industrial (INTI); 2009. Ensayo: 4.
- Sin D, Chan PK, Cheung S, Wong YL, Wong SK, Mok CS, Wong YC. Development of a candidate certified reference material of cypermethrin in green tea. *Anal Chim Acta*. 2012; 721: 110 – 114.
- Taverniers I, De Loose M, Van Bockstale E. Trends in quality in the analytical laboratory. Analytical method validation and quality assurances. *TrAC, Trends Anal. Chem.* 2004b; 23: 535-551.
- Taverniers I, Van Bockstale, E De Loose M. Trends in quality in the analytical laboratory. Traceability and measurement uncertainty of analytical result. *TrAC, Trends Anal. Chem.* 2004a; 23: 480-490.
- Thompson M, Ellison S, Wood R. The international harmonised protocols the proficiency testing of analytical chemistry laboratories. *Pure Appl Chem*. 2006; 78 (1): 145 – 196.
- Una Norma Española – European Norm (UNE-EN), International Organization for Standardization (ISO). UNE-EN ISO/IEC 17025. Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración. AENOR; 2015.
- Valcárcel M. Principios de Química Analítica. 1ª ed. Barcelona: Springer – Verlag; 1999.
- Valcárcel M, Ríos A. La Calidad en los Laboratorios Analíticos. 1ª ed. Barcelona: Reverte; 2009.
- Vocabulario Internacional de Metrología (VIM). Conceptos fundamentales y generales y términos asociados. 3ª ed. Centro Español de Metrología (CEM), Ministerio de Industria, Energía y Turismo. Gobierno de España; 2012.
- Youden WJ. Graphical diagnosis of interlaboratory test results. *Ind Qual Control*. 1959; 15 (11): 24 – 28.