

UNIVERSIDAD NACIONAL DE INGENIERÍA.

FACULTAD DE CIENCIAS.



TRABAJO DE SUFICIENCIA PROFESIONAL

“VALIDACIÓN DEL METODO DE HISTAMINA POR LA TÉCNICA DE CROMATOGRAFÍA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN EN HARINA DE PESCADO Y CONSERVA DE PESCADO”.

PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE
LICENCIADO EN QUÍMICA.

ELABORADO POR

GENOVEVA JANNET LEON NEYRA

ASESOR

M. Sc.: ILY MARILU MAZA MEJIA

LIMA – PERÚ

2014

CONTENIDO.

CAPÍTULO 1 : FUNDAMENTO TEÓRICO	1
1.1 La Histamina (Hm).	1
1.2 Toxicidad de Hm.	2
1.3 Contenido de Hm en harina y conserva de pescado.	4
1.4 Validación de un método de ensayo.	4
1.4.1 Veracidad.....	8
1.4.2 Normalidad de los datos.	9
1.4.3 Determinar la consistencia de valores rezagados, erráticos o atípicos.	10
1.4.4 Homogeneidad.....	14
1.4.5 Precisión.	15
1.4.6 La Linealidad.....	18
1.4.7 Límite de Detección (LD) y Límite de cuantificación (LC).....	22
1.4.8 La Sensibilidad.	22
1.4.9 La Selectividad.	23
1.4.10 El rango.	25
1.4.11 La Robuztes.	26
1.4.12 Estimación de la Incertidumbre.....	26
CAPÍTULO 2 : PARTE EXPERIMENTAL.	28
2.1 Condiciones del Equipo HPLC.....	28
2.1.1 Equipos y Materiales	28
2.1.2 Procedimiento Experimental del Método.....	28
2.1.3 Cálculo de la concentración.....	29
2.2 Proceso de Validación.	30
2.2.1 Veracidad.....	30
2.2.2 Prueba de Normalidad.	31
2.2.3 Ecrutinio de datos para la precisión	31
2.2.4 Homogeneidad.....	31
2.2.5 Precisión.	32
2.2.6 Pruebas de la linealidad.	32

2.2.7	Límite de detección (LD)	32
2.2.8	Límite de cuantificación (LC)	33
2.2.9	Sensibilidad del método.	33
2.2.10	Selectividad.	33
2.2.11	Rango del método.....	34
2.2.12	Robustez del método.	34
2.2.13	Estimación de la incertidumbre del método.	34
CAPÍTULO 3 : RESULTADOS Y DISCUSIÓN.		38
3.1	Veracidad.	38
3.2	Prueba de Anderson Darling.....	42
3.3	Escrutinio de datos.....	44
3.4	Homogeneidad.....	51
3.5	Precisión.....	53
3.6	Linealidad.	56
3.7	Límite de detección y límite de cuantificación.....	58
3.8	Sensibilidad.....	60
3.9	Selectividad del método.....	61
3.10	Rango	63
3.11	Robustez.....	63
3.12	Estimación de la incertidumbre.	68
CAPÍTULO 4 : CONCLUSIONES.		69

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1.1. Grado de Variabilidad.....	17
Tabla 3.1. Resultados de los porcentajes de recuperación para las tres primeras concentraciones de Histamina.....	38
Tabla 3.2. Resultados de los porcentajes de recuperación para las tres últimas concentraciones de Histamina.....	39
Tabla 3.3. Resultados de los porcentajes de recuperación para los tres niveles de concentraciones de histamina evaluados en las muestras de conserva de pescado, realizando seis replicas por cada uno de los niveles.....	40
Tabla 3.4. Análisis de varianza en porcentaje de recuperación (nivel de confianza de 95%) y análisis de varianza de un factor para la harina de pescado.....	41
Tabla 3.5. Análisis de varianza en porcentaje de recuperación (nivel de confianza de 95%) y análisis de varianza de un factor para la conserva de pescado.....	41
Tabla 3.6. Valores de p-valor obtenidos de la evaluación de la prueba de normalidad a cada una de las siete concentraciones de histamina en harina de pescado.....	42
Tabla 3.7. Valores de p-valor obtenidos de la evaluación de La Prueba de normalidad de las dos niveles de concentraciones de histamina en conserva de pescado.....	43
Tabla 3.8. Resultados de precisión de la Histamina (ppm) en conserva de pescado para los dos niveles de concentración.....	44
Tabla 3.9. Resultados de precisión de la histamina (ppm) en harina de pescado para los siete niveles de concentración.....	45
Tabla 3.10. Resultados de h y K de MANDEL en los niveles de concentración de histamina en harina de pescado.....	46
Tabla 3.11. Resultados de h y K de MANDEL en los dos niveles de concentración de histamina en conserva de pescado.....	47
Tabla 3.12. Resultados de Cochran para los siete niveles de concentración de histamina en harina de pescado para el analista A, B y C.....	49
Tabla 3.13. Resultados de Cochran para los dos niveles de concentración de Histamina en conserva de pescado.....	50
Tabla 3.14. Evaluación de Grubbs para los resultados de histamina en harina de pescado para los analistas A, B y C.....	50
Tabla 3.15. Resultados de Grubbs para los datos de determinación de Histamina en conserva de pescado.....	51
Tabla 3.16. Resultados de la prueba de Bartlett en harina y conserva respectivamente.....	52
Tabla 3.17. Resultados de la desviación estándar de repetibilidad (sr) y Reproducibilidad (sR) en harina y conserva respectivamente.....	54
Tabla 3.18. Resultados de la desviación estándar relativa de repetibilidad (RSDr) y de reproducibilidad (RSDR) en harina y conserva respectivamente.....	54
Tabla 3.19. Resultados de los límites de repetibilidad (r) y los límites de reproducibilidad (R) en harina y conserva respectivamente.....	55
Tabla 3.20. Límites de desviación estándar relativa de repetibilidad y reproducibilidad en harina y conserva respectivamente.....	55
Tabla 3.21. Curvas de calibración para evaluación la linealidad del método.....	56

Tabla 3.22 Resultados de la prueba de hipótesis de la pendiente y del intervalo	57
Tabla 3.23 Resultados de la prueba para demostrar la convergencia al origen	57
Tabla 3.24 Resultados de la prueba de hipótesis para el coeficiente de.....	57
Tabla 3.25 Análisis de la regresión y la lineal	58
Tabla 3.26 Muestra el resultado de la desviación estándar de las seis áreas de.....	58
Tabla 3.27 LD y LC calculados como muestra.....	60
Tabla 3.28 LD y LC establecidos para el método.....	60
Tabla 3.29 Datos de la regresión lineal.....	60
Tabla 3.30 Resultados de la evaluación de la selectividad para harina de pescado.....	61
Tabla 3.31.Evaluación del contraste de la t	62
Tabla 3.32.Resultados de la evaluación de la Selectividad para conserva de pescado.....	62
Tabla 3.33.Valor del F y p-valor obtenido del análisis de regresión y la linealidad.....	63
Tabla 3.34 Primer y último punto de la curva de calibración para obtener el rango del método.....	63
Tabla 3.35.Resultados de la t calculado para el primer nivel de concentración de histamina en harina de pescado.....	64
Tabla 3.36.Resultados del t calculado para el segundo nivel de concentración de histamina en harina de pescado.....	64
Tabla 3.37.Resultados del t calculado para el tercer nivel de concentración de histamina en harina de pescado.....	65
Tabla 3.38.Resultados del t calculado para el cuarto nivel de concentración de histamina en harina de pescado.....	65
Tabla 3.39.Resultados del t calculado para el quinto nivel de concentración de histamina en harina de pescado.....	66
Tabla 3.40.Resultados del t calculado para el sexto nivel de concentración de histamina en harina de pescado.....	66
Tabla 3.41.Resultados del t calculado para el sexto nivel de concentración de histamina en harina de pescado.....	67
Tabla 3.42.Resultados del t calculado para el primer nivel de concentración de histamina en conserva de pescado.....	67
Tabla 3.43.Resultados del t calculado para el segundo nivel de concentración de histamina en conserva de pescado.....	68
Tabla 3.44 Ecuaciones de la estimación de la incertidumbre en harina de pescado y conserva de pescado.....	68

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1.Estructura de la histamina. ¹⁶	1
Figura 2.Conversión de L-histidina a la histamina y a 3-tele-metil-histamina ¹²	1
Figura3.Se muestra los gráficos de normalidad evaluados en el programa minitab para las siete concentraciones de histamina en harina de pescado.....	43
Figura 4.Se muestra los gráficos de normalidad evaluados en minitab para los dos niveles de concentraciones de histamina en conserva de pescado.....	44
Figura 5.Cálculo h de MANDEL para harina de pescado	47
Figura 6.Cálculo h de MANDEL para conserva de pescado	48
Figura 7.Cálculo K de MANDEL para harina de pescado.....	48
Figura 8.Cálculo K de MANDEL para conserva de pescado	49
Figura 9.Prueba de Homogeneidad de Bartlett en harina de pescado para el nivel I hasta el nivel VII.	53
Figura10.Prueba de Homogeneidad de Bartlett en conserva de pescado para el nivel I y nivel II.....	53
Figura 11.Tabla de valores críticos para la prueba de Cochran ⁵	76
Figura 12.Tabla de valores críticos para la prueba de Grubbs ⁵	77
Figura 13.Tabla de valores de t de Student ¹²	78

RESUMEN.

En el presente informe se desarrolla la validación del método de análisis de histamina (Hm) en harina de pescado y conserva por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Se evaluaron los siguientes parámetros de calidad: La veracidad, la precisión del método, la linealidad del método, el límite de detección, el límite de cuantificación, la sensibilidad, la selectividad, el rango de trabajo del método, la robustez y la estimación de la incertidumbre. La histamina es una amina biogénica que se forma de la reacción de descarboxilación del aminoácido histidina. Que puede estar presente frecuentemente en pescados de la familia *Escómbridos*, *Cupleido* y *Engraulis ringens* su consumo genera síntomas de intoxicación. El análisis de cuantificación de la Hm se realizó con una nueva metodología con un equipo cromatográfico que tiene un detector UV-visible y se utilizó también la técnica de derivatización pre columna entre otros equipos. La validación del método de análisis es interna se hizo uso de la guía de laboratorios para la validación de métodos y temas relacionados el laboratorio donde se realiza está acreditado con la norma NTP ISO/IEC 17025 2006 (Norma técnica peruana). Mediante pruebas estadísticas se llegó a comprobar que el método responde con todos los parámetros evaluados para luego concluir que se cumple con la validación.

INTRODUCCION.

El ministerio de la producción permite la pesca de anchoveta dos veces al año en las distintas zonas del litoral del norte, centro y sur. El mar peruano tiene una gran riqueza pesquera como la anchoveta y otras especies para uso industrial. Estas especies se convierte en harina de pescado principalmente y en conservas. Las empresas pesqueras peruanas exportan la harina de pescado por lo cual se realiza el control de calidad en el laboratorio antes de su venta: incluido la cantidad de proteína, grasa, humedad, ceniza, histamina (Hm), etoxiquina y cloruros. Con estos resultados clasifican la harina para poder exportarlas.

Es relevante constatar que el resultado de un análisis es el correcto cuantificar un analito debe ser confirmado mediante pruebas que aseguren que es el resultado correcto porque de esto depende, de que no llegue al consumidor productos terminados que pueden causar problemas de salud también influyen en la toma de decisiones para clasificarlos dentro de un proceso, poner costos, poner la etiqueta nutricional, autorizaciones de manipulación y consumo, etc.

El informe de validación de la determinación de la histamina en harina de pescado y conserva de pescado por la técnica de HPLC y una derivatización pre columna. En este informe, se muestra los parámetros que se tienen que realizar para desarrollar y concluir la validación de este método. Entre estos parámetros se considera: veracidad, precisión, linealidad, límite de detección, cuantificación, robustez, rango de trabajo, sensibilidad, selectividad y estimación de la incertidumbre. Con la validación se comprobó que el método analítico que ha sido modificado ha sido implementado con éxito y da resultados exactos el enfoque se dirige hacia la validación por que este asegura, completa y concluye el análisis de un método analítico

El laboratorio que acredita un método de ensayo con la norma NTP ISO/IEC 17025 2006 debe cumplir los requisitos solicitados estos deben de asegurar los resultados obtenidos durante el ensayo. La norma también manifiesta con respecto a la validación que si el método a implementar en el laboratorio es normalizado o no lo es. Existen tres casos: Los métodos de ensayos no normalizado, Los métodos de ensayos normalizados modificados, ampliados o aplicados a un alcance diferente al originalmente establecido en la norma, Cuando se requiere demostrar la equivalencia entre dos métodos de ensayo en este caso el método a validar es un método que ha sido modificado de la AOAC Oficial Método 977.13 18th. Edición 2005 Histamina

en Alimentos del Mar y se utilizó como referencia el Journal AOAC Internacional Vol. 76 N°3 1993. Por ello se requiere una validación completa y comprobar las partes para cada una es necesario evaluar con alguna prueba estadística adecuada que permitirá concluir si son estadísticamente significativos, dentro de un rango de porcentaje de confianza que puede variar entre 99% a 95%, considerando que los resultados obtenidos son datos normales. Existen pruebas estadísticas llamadas paramétricas para evaluar los resultados con comportamiento normal.

En la actualidad La norma técnica peruana NTP ISO/IEC 17025 2006 se fija en el documento Guía de Validación publicada en El Peruano con el fin evitar ambigüedad sobre la validación. Esta norma manifiesta que validar es un requisito que se debe cumplir pero no explica cómo realizarlo es por eso que para la validación se toma como referencia la guía de Eurachem, traducido por el Cenam de México y otras referencias bibliografías ^{2,3,4,5,6} para el desarrollo del presente informe.

En este estudio se esperó que todas estas evaluaciones nos permitan corroborar que el método modificado empleado, por todo lo expuesto, se comporte tan igual. La validación se realizó en el laboratorio de instrumental orgánica SGS del Perú sede Callao acreditado ante el ente acreditador del Perú llamado Inacal.

OBJETIVO.

Desarrollar la validación del método analítico para la determinación de histamina en harina de pescado y conserva de pescado por la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) la cual implica evaluar y confirmar que el método está cumpliendo los siguientes parámetros:

- i. La veracidad.
- ii. La precisión del método.
- iii. La linealidad del método.
- iv. Límite de detección y el límite de cuantificación.
- v. La sensibilidad.
- vi. La selectividad.
- vii. El rango de trabajo del método.
- viii. La robustez.
- ix. La estimación de la incertidumbre.

CAPÍTULO 1 : FUNDAMENTO TEÓRICO.

1.1 La Histamina (Hm).

La histamina cuyo nombre químico es 2-(4-imidazol) etilamina tiene en su estructura un anillo imidazol y un grupo etilamino como cadena lateral y su fórmula general es $C_5 H_9 N_3$, tal como se muestra en la siguiente figura:

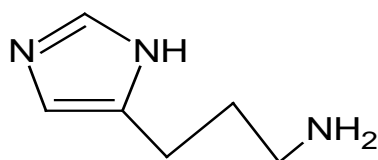


Figura 1 Estructura de la histamina.¹²

La histamina es el producto de la reacción de descarboxilación del aminoácido L-histidina, catalizada por la enzima descarboxilasa de histidina¹²

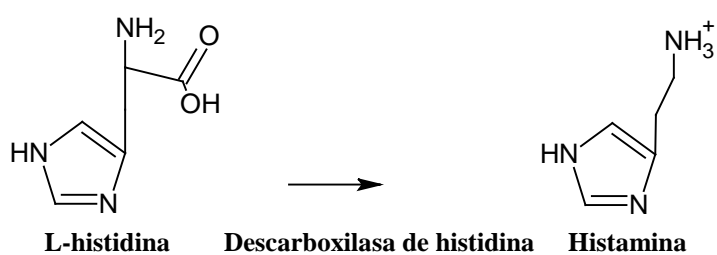


Figura 2 Conversión de L-histidina a la histamina¹²

Las bacterias asociadas a la formación de histamina se encuentran comúnmente en las agallas y en los intestinos del pez vivo, una vez muerto el pez sus mecanismos de defensa no disminuyen el crecimiento bacteriano, aumentando el número de bacterias que aprovechan la histidina libre. Los pescados contienen grandes cantidades de histidina libre en el tejido muscular donde se produce la reacción de formación de la histamina. Por otra parte puede también ser descarboxilada la histidina por acción de microorganismos (“*Proreus Morganii*, *Klebsiella*, *Vibrio sp*, *Clostridium sp*, *Lactobacillus sp*” asociado a la producción de niveles tóxicos de histamina). La histamina es una amina biogénica que no es sintetizada por el organismo humano sino que su presencia está ligada al consumo de alimentos contaminados o fuera de las condiciones óptimas de su almacenamiento y transporte. Ambos procesos son detenidos con la higiene y almacenamiento a bajas temperaturas (menor a cuatro grados centígrados) son medidas necesarias en los pescados (familia escombroides).¹

1.2 Toxicidad de Hm.

El envenenamiento por consumir especies como el atún, bonito y la caballa (pescados escombroides) es frecuente aunque otros pescados como la sardina, arenque, salmón y alimentos como queso, jamón o fermentados también pueden ocasionar este tipo de envenenamiento. A pesar de que muchos casos de intoxicación y mortalidad por consumo de pescados han sido atribuidos a la presencia de histamina su relación no ha sido completamente entendida ya que la histamina tomada por vía oral es alterada antes de alcanzar el torrente sanguíneo por la acción de los diversos jugos gástricos. Sin embargo cuando la ingestión por vía oral de histamina es acompañada del consumo de atún fresco puede producir efectos tóxicos aún en dosis moderadas. Lo que se explica de la siguiente manera la histamina y las poliamidas como: la putrescina, la cadaverina, espermina y espermidina se potencian entre ellas compiten para enlazarse a la mucosa del estómago lo que causa la menor degradación de la histamina libre y mayor presencia en el torrente sanguíneo. Otros potenciadores también son la trimetilamina y el óxido de trimetilamina todas estas sustancias están simultáneamente presentes con la histamina en los alimentos su ingestión combinada es inevitable. Se dan tres factores de contaminación del pescado escombroides que son muy frecuentes:

- i. La velocidad con que los niveles tóxicos de histamina son alcanzados.
- ii. La dificultad de detectar este tipo de descomposición mediante la apariencia y olor del pescado.
- iii. El amplio rango de valores de histamina que se puede presentar para pescados de un mismo lote.¹

La evidencia concreta es el consumo de pescado contaminado y la consecuente intoxicación. La dosis tóxica mínima no ha sido establecida debido a la diferencia de los niveles de histamina en el pescado descompuesto y a la variabilidad de respuesta de los pacientes intoxicados. La dosis a fines de los años cincuenta fue establecida en 60 ppm de Hm dato que ha sido cuestionado y corregido en el tiempo ya en la actualidad sobre la base de estudios epidemiológicos se ha llegado a las siguientes relaciones entre el contenido de histamina y el pescado fresco:

- i. < 5 mg / 100 g de Hm (< 50 ppm): Pescado normal, seguro para su consumo.
- ii. 5 – 20 mg / 100 g de Hm (50 – 200 ppm): Pescado maltratado y posiblemente tóxico.
- iii. 20 – 100mg / 100 g de Hm (200 – 1000 ppm): Pescado no satisfactorio, probablemente tóxico¹.

Algunas regulaciones que establecen límites máximos permisibles para la comercialización de consumo de pescado y sus productos se muestran a continuación. Según el Diario Oficial de las Comunidades Europeas en lo referente a las modalidades de control en las pruebas químicas sobre histamina, se dictamina lo siguiente: se tomarán nueve muestras de cada lote para ser estudiadas su valor promedio deberá ser inferior a 100 ppm, dos de las muestras podrán tener un valor superior a 100 ppm e inferior 200 ppm, ninguna de las muestras podrá tener un valor superior 200 ppm. Los que han sido procesados en salmuera podrán presentar contenidos de histaminas elevadas pero sin superar los 400 ppm por muestra. Estos niveles máximos se aplicarán únicamente a los pescados de la familia de los Escómbridos y Cupleidos. La norma europea también solo contempla a los escómbridos y a los cupleidos en Nueva Zelandia están considerando especies de riesgo a todas aquellas que contengan un alto contenido de histidina libre en el músculo. En Estados Unidos reglamentaciones dadas sobre los niveles de histamina en pescados están mencionadas en La Guía de Control y Peligro de Pescados y Productos Pesqueros de la La administración de Alimentos y Drogas (por sus siglas en ingles FDA) que establece que los niveles de histamina no deberán exceder los 50 ppm para pescado fresco y de los 200 ppm para pescado enlatado. Las especies consideras de riesgo (300 ppm de Hm)¹ en el mar peruano es la anchoveta (*Engraulis ringens*), la sardina (*Sardinops sagax sagax*), el machete de hebra (*Opisthonema libertate*) y el machete (*Ethmidium maculatum*). En el país, se toma en cuenta valores dados por la FDA, Codex (Código Alimentario) y se adaptan a nuestros fines. La industria pesquera peruana hace uso del manual: Indicadores o Criterios de Seguridad Alimentaria e Higiene para Alimentos y Piensos de Origen Pesquero y Acuícola de la Dirección del Servicio Nacional de Sanidad Pesquera (ITP: Instituto Tecnológico Pesquero) donde indican el marco, las condicione, los límites permitidos y se menciona el Plan de Evaluación para el Control de Histamina en Productos de la Pesca. Las pruebas para cuantificar la Hm deberán realizarse con métodos veraces y científicamente reconocidos como las técnicas cromatográfica y fluorométrica que son oficialmente aceptadas.¹

La ingestión de pescado con histamina es el inicio de la intoxicación sintiéndose los efectos cinco minutos a unas horas después de su consumo. Los síntomas son urticarias, enrojecimiento, erupciones en la piel, náusea, diarrea, hipertensión, palpitaciones, dificultades para respirar entre otros síntomas. En casos de pacientes graves se les medica antihistamínicos.

1.3 Contenido de Hm en harina y conserva de pescado.

La harina de pescado es el ingrediente principal en los alimentos balanceados por su alto contenido nutricional. Los alimentos balanceados son consumidos por aves, cerdos, peces, perros entre otros. El contenido nutricional de la harina de pescado es el porcentaje alto de proteínas, grasas, minerales y vitaminas.

El contenido de Hm en la harina y en la conserva va a depender de la cantidad de Hm que contiene el pescado fresco que ingreso, del enfriamiento del pescado, el uso de aditivos alimentarios y de si se adiciono agua de cola (que se obtiene después de la operación de centrifugado y contiene porcentajes de sólidos y humedad) al proceso. La producción de harina de pescado de alta calidad contiene menos de 500 ppm de Hm y la harina común contiene entre 1000 ppm a 1500 ppm de Hm¹⁷. En la producción de alimentos balanceados la harina de pescado solo aporta alrededor de un 10% del total del producto, entonces, una harina de 250 ppm de Hm aportará solo un décimo de su masa, el valor final de histamina en el alimento balanceado será de 25 ppm que es considerado valor no peligroso. La calificación general promedio solicitado por los compradores de harina de pescado peruano, referente a la concentración de histamina es: Harina Súper-Prime, concentración por debajo de 250 ppm; Harina Prime, concentraciones que llegan hasta 600 ppm; Harina Estándar por encima de 600 ppm, existiendo diferentes calidades¹.

El Comité del Codex sobre pescado y productos pesqueros publicó un documento de Tratado de la Histamina preparado por Japón y los Estados Unidos de América donde mencionan los límites de Hm para la conserva de pescado. La sardina, atún, bonito y pescados en conserva no deberán contener más de 100 ppm de Hm según el promedio de la unidad de muestra analizada para la descomposición en el caso de la higiene y manipulación ninguna unidad de muestra deberá contener una concentración de Hm superior a 200 ppm.

1.4 Validación de un método de ensayo.

- a) Es un proceso que define requisitos analíticos, que aseguran que el método de ensayo ha desarrollado capacidades consistentes con la aplicación requerida. La validación establece, mediante estudios sistemáticos de laboratorio, que las características técnicas de dicho método cumple las especificaciones relativas al uso previsto de los resultados analíticos.

Un método de ensayo se valida cuando es necesario verificar que los parámetros ejecutados son los adecuados para resolver un problema analítico en particular. El laboratorio debe validar:

- i. Los métodos de ensayos no normalizados.
- ii. Los métodos de ensayo normalizados modificados, ampliados o aplicados a un alcance diferente al originalmente establecido en la norma.
- iii. Cuando se requiere demostrar la equivalencia entre dos métodos de ensayo.

Método de Ensayo Normalizado, es aquel método de ensayo desarrollado por un Organismo de Normalización u otras organizaciones reconocidas nacional e internacionalmente y que son aceptadas por el sector técnico involucrado. Por ejemplo El Instituto Nacional de Defensa de la Competencia y de la Protección de la Propiedad Intelectual INDECOPI, Organización Internacional de Normalización (International Organization for Standardization en inglés) ISO, Asociación Americana de Ensayo de Materiales (American Society of Testing Materials en inglés), ASTM, Las Asociaciones de Comunidades Analíticas (Association of Analytical Communities en inglés) AOAC, Asociación Americana de Salud Pública (The American Public Health Association en inglés) APHA Asociación Americana del Agua (the American Water Works Association en inglés) AWWA, Administración de Drogas y Alimentos (Food and Drug Administration en inglés). FDA Un Método de Ensayo no Normalizado, es aquel método de ensayo desarrollado por el propio laboratorio u otras partes no reconocidas. Por ejemplo, métodos de ensayo publicados o recopilados en revistas técnicas o texto; métodos de ensayo de fabricantes de bienes tales como equipos, "kits" de ensayo, instrumentos portátiles. Un método de ensayo normalizado modificado, ampliado o aplicado a un alcance diferente al originalmente establecido en la norma, se considera también un método de ensayo no normalizado.

b) La validación deben contener la determinación de los siguientes parámetros a evaluar:

- i. Veracidad.
- ii. Precisión (repetibilidad y reproducibilidad)
- iii. Selectividad /especificidad.
- iv. Rango (intervalo de trabajo)
- v. Linealidad /función respuesta.
- vi. Límite de detección.
- vii. Límite de cuantificación.
- viii. La estimación de la Incertidumbre.
- ix. Sensibilidad.
- x. Robustez.

1. Veracidad: Es el grado de concordancia existente entre el valor medio obtenido de una gran serie de resultados y un valor aceptado como referencia.⁴
2. Exactitud: Grado de concordancia existente entre el resultado del ensayo y un valor aceptado de referencia⁴
El término exactitud cuando se aplica a un conjunto de resultados de mediciones implica la combinación de los resultados aleatorios y de un error sistemático común o de un componente del sesgo.
3. Precisión: Grado de concordancia existente entre los resultados independientes de un ensayo obtenidos en condiciones estipuladas.⁵ Tener en cuenta lo siguiente:

La precisión depende únicamente de la distribución de los errores aleatorios y no está relacionada con el valor verdadero o especificado.
La precisión se expresa generalmente en términos de la falta de precisión, calculándose a partir de la desviación típica de los resultados. A mayor desviación típica, menor precisión.
Resultados de ensayos independientes significa resultados obtenidos sin que existan influencias de un resultado previo sobre el mismo objeto o similar de ensayo. La expresión cuantitativa de la precisión depende en forma crítica de las condiciones estipuladas. Las condiciones de repetibilidad y reproducibilidad son conjuntos particulares de condiciones extremas.
4. Precisión Intermedia: Expresa la variación dentro del laboratorio: diversos días, diversos analistas, diversos equipos, etc. ¹³
5. Repetibilidad: Es la precisión bajo condiciones de repetibilidad.⁴
6. Condiciones de Repetibilidad: Son las condiciones bajo las que se obtienen resultados independientes, con el mismo método, sobre idénticas muestras, en el mismo laboratorio, por el mismo operador, y utilizando los mismos equipos de medición, durante un corto intervalos de tiempo.⁴
7. Reproducibilidad: Es la precisión bajo condiciones de reproducibilidad.
8. Condiciones de reproducibilidad: Son las condiciones bajo los cuales los resultados se obtienen con el mismo método, sobre muestras idénticas, en laboratorios diferentes, con operadores distintos y utilizando equipos diferentes⁴
9. Selectividad / Especificidad: Es el grado en que un método puede determinar un analito particular dentro de una muestra compleja, sin ser interferido por otros componentes de la mezcla. La capacidad de un método para determinar exactamente y específicamente el analito de interés en la presencia de otros componentes en una matriz de la muestras bajo condiciones indicadas de la prueba.¹³

10. Rango: Es el intervalo entre la más alta y más baja concentración (cantidades) del analito en la muestra, para la cual se ha demostrado que el método analítico tiene un nivel apropiado de precisión, veracidad y linealidad que es mencionado en el texto validación of analytical procedures. ICH Harmonised Tripartite Guideline.
11. Linealidad: Es la relación entre la concentración del analito y la respuesta del método. Esta relación, denominada comúnmente curva patrón o curva de calibración, no tiene por qué ser lineal para que el método sea eficaz. Cuando no sea posible la linealidad para un método, se deberá encontrar un algoritmo adecuado. Define la capacidad del método para obtener los resultados de la prueba proporcionales a la concentración del analito.
12. Límite de Detección Instrumental (LDI): Es la concentración del constituyente que produce una señal más grande que cinco veces la proporción señal / ruido del instrumento. Este es similar, en muchos casos, al nivel crítico de detección. El último nivel es establecido como 1.645 veces la desviación estándar del análisis de blancos.
13. Límite de Detección: De un procedimiento analítico es la menor cantidad de un analito en una muestra la cual puede ser detectada pero no necesariamente cuantificada con un valor exacto. El contenido más bajo que se puede medir con certeza estadística razonable. La concentración más baja del analito en una muestra que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificable bajo condiciones indicadas de la prueba.¹³
14. Límite de Cuantificación: Es la concentración mínima que se puede determinar con un nivel aceptable de exactitud y precisión. Se establece analizando una muestra o material de referencia apropiado. El contenido igual o mayor que el punto de más bajo concentración en la curva de calibración¹³. La concentración más baja de un analito que se puede determinar con aceptable precisión (repetibilidad) y exactitud bajo condiciones indicadas de la prueba¹³.
15. Sensibilidad: Es el cambio en la respuesta de un instrumento de medida dividido por el cambio correspondiente en el estímulo.
La concentración de mesurando presente puede ser el estímulo. La sensibilidad puede depender del valor estímulo. Esta definición se aplica claramente a un instrumento de medida, puede también ser aplicada al método analítico en su totalidad, considerando otros factores tales como el efecto de la concentración medida.
16. Robustez: Es la medida de la resistencia de un método al cambio de respuesta cuando se introduce pequeñas variaciones en el procedimiento. La robustez de un procedimiento analítico es una medida de su capacidad de no ser afectado por pequeñas, pero deliberadas variaciones en parámetros del método, y proporcionan una indicación de su confiabilidad durante su normal uso ¹³

c) Después de cumplir todas las etapas del proceso de validación es importante documentar los procedimientos que comprenden el método de estudio de modo que pueda ser implementado de manera clara y sin ambigüedades. La documentación apropiada favorece la aplicación consistente del método, pues durante un proceso de validación, se asume una vez implementado el método. Este será siempre ejecutado conforme al procedimiento definido en dicho proceso, de lo contrario el desempeño real del método no corresponderá a lo previamente establecido en el proceso de validación. Por lo tanto, la documentación debe ser redactada de tal manera que minimice la ocurrencia de variaciones accidentales en la realización del método y de modo que toda persona que tenga acceso al mismo, cuente con la información justa y necesaria para reproducir su ejecución. Una forma práctica de probar que la documentación del método es consistente, es solicitar a otros analistas del laboratorio la ejecución del ensayo siguiendo el método descrito. Si los resultados obtenidos por los analistas corresponden a lo esperado, entonces es probable que el método pueda ser utilizado por cualquier analista competente con resultados consistentes. De no ser así, puede ser necesario re-escribir el método con más detalle para evitar ambigüedades. Por otro lado, la documentación de los métodos constituye una parte importante del sistema de calidad del laboratorio y deben estar sujetos a un control eficaz de documentos, de modo que se asegure que solo los métodos y procedimientos validados serán utilizados. El método documentado debe indicar cuándo concluyó la validación respectiva y cuándo fue autorizado para su uso²¹.

1.4.1 Veracidad.

La veracidad y la precisión permiten determinar la exactitud de los resultados un resultado puede cumplir la veracidad pero no la precisión, puede ser preciso pero no cumplir la veracidad y también no ser preciso ni veraz.

Análisis de la varianza con un factor (ANOVA) o prueba ANOVA

El análisis de la varianza permite contrastar la hipótesis nula de que las medias de K poblaciones ($K > 2$) son iguales, frente a la hipótesis alternativa de que, por lo menos, una de las poblaciones difiere de las demás en cuanto a su valor esperado. Este contraste es fundamental en el análisis de resultados experimentales, en los que interesa comparar los resultados de K tratamientos o factores con respecto a la variable dependiente o de interés.

$$H_0 : \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \dots = \mu_k = \mu$$

$$H_1 : \exists \mu_j \neq \mu \quad j = 1, 2, \dots, K$$

Dónde:

μ_k : media de la población k

$\exists \mu_j$: existe una media llamada j

K: llamado población.

El ANOVA requiere el cumplimiento de los siguientes supuestos:

- i. Las poblaciones (distribuciones de probabilidad de la variable dependiente correspondiente a cada factor) son normales.
- ii. Las K muestras sobre las que se aplican los tratamientos son independientes.
- iii. Las poblaciones tienen todas igual varianza o homocedasticidad.

Se evaluarán con el estadístico de Fisher, donde Fisher calculado debe ser mayor al Fisher crítico o el p-valor calculado debe ser mayor a 0.05 para que se cumpla la hipótesis nula donde las medias sean significativamente iguales.

1.4.2 Normalidad de los datos.

1.4.2.1 Distribución normal estándar

Si x es una variable aleatoria continua que tiene una distribución normal con media μ y variancia σ^2 ; luego, la variable aleatoria $Z=(x-\mu)/\sigma$ tiene una distribución normal con media cero y variancia 1, y su función de densidad es:

$$f(z) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{z^2}{2}} \quad (1.1)$$

Si $-\alpha < z < \alpha$, donde se cumple lo anterior mencionado, esta distribución es usada para determinar la probabilidad de ocurrencia de una variable que tiene una distribución normal cualquiera. Para esto, es necesario hacer una transformación del intervalo de análisis mediante un proceso llamado estandarización.

1.4.2.2 Prueba de normalidad de Anderson Darling

Esta prueba se aplica a datos provenientes de una muestra aleatoria de tamaño n asociada con alguna función de distribución desconocida, denotada por $F(x)$. Esta prueba se realiza con los residuales, importante en el análisis de la verificación de las suposiciones del modelo. La asunción es una muestra aleatoria. Las hipótesis son las siguientes:

H_0 : La muestra aleatoria tiene una distribución normal.

H_a : La muestra aleatoria no tiene una distribución normal.

Regla de decisión indica que se rechaza H_0 a un nivel de significancia aproximado de 0.05 o 95% si p-valor es inferior a 0.05. La prueba de normalidad de Anderson-Darling puede ser también gráfica se realiza con los residuales, a través del ploteo de la distribución de los puntos alrededor de la recta con el fin de determinar la normalidad de un conjunto de datos y se evalúa de acuerdo a un p-valor. Donde la

regla de decisión es la siguiente, si en el gráfico se observa que la recta (los cuantiles teóricos de la distribución normal) y los datos están entorno de esta recta, por lo tanto, se puede aceptar que el conjunto de datos se ajusta a una distribución normal.

1.4.2.3 Residuales.

Es la diferencia entre los valores observables y_{ij} menos la media general \bar{y}_i con la siguiente formula⁶.

$$\epsilon_{ij} = y_{ij} - \bar{y}_i \quad (1.2)$$

1.4.3 Determinar la consistencia de valores rezagados, erráticos o atípicos.

Valor inconsistente: Es un miembro de un conjunto de valores que es inconsistente con los otros miembros de ese conjunto

Valor errático o atípico: Son registros que se encuentran entre los laboratorios de ensayos originales, o en las tablas derivadas de dichos resultados, y que se desvían demasiado de los registros comparables en la misma tabla y, por lo tanto, son considerados irreconciliables con los otros datos

Valores Rezagados: Son registros que se desvían regularmente de los registros comparables en la misma tabla y por lo tanto, son considerados como valores sospechosos. La eliminación de un valor rezagado dependerá del investigador.

Prueba de MANDEL (h y K): Es la prueba grafica para determinar la inconsistencia del método de ensayo dentro del laboratorio y entre laboratorios.

Prueba de Cochran y Grubbs: La prueba de Cochran es una prueba numérica para analizar la variabilidad dentro del laboratorio. La otra prueba de Grubbs es una prueba de variabilidad entre laboratorios.

1.4.3.1 Técnicas estadísticas para detectar valores inconsistentes.

Para detectar valores inconsistentes y poder tomar decisiones con respecto a ellos aplican las siguientes técnicas

1.4.3.2 Técnica grafica de consistencia

Se utilizan dos estadísticos llamadas Prueba h de MANDEL y K de MANDEL

a) Cálculo de la estadística de la consistencia entre laboratorios, h, para cada laboratorio.

$$h_{ij} = \frac{\bar{y}_{ij} - \bar{y}_j}{\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{p_j} (\bar{y}_{ij} - \bar{y}_j)^2}{(p_j - 1)}}} \quad (1.3)$$

En el cual :

$$\bar{y}_{ij} = \frac{1}{n_{ij}} \sum_{k=1}^{n_{ij}} y_{ijk} \quad (1.4)$$

y para :

$$\bar{y}_j = \frac{\sum_{i=1}^p n_{ij} \bar{y}_{ij}}{\sum_{i=1}^p n_{ij}} \quad (1.5)$$

h : Estadística de la prueba de consistencia entre laboratorios de MANDEL

m: Media general de la propiedad de ensayo.

n : Número de resultados de ensayo.

p: número de laboratorios que participan en el interlaboratorio.

\bar{Y} : Media aritmética de resultados del ensayo.

Símbolos utilizados como subíndice.

i: Identificador de un laboratorios en particular.

j: Identificador de un nivel particular.

Graficar los valores de h para cada celda en orden de laboratorio, en grupos para cada nivel y comparar con las líneas trazadas en el gráfico de barras, correspondiente a los límites de h para 1% y 5% de nivel de significancia indicadas en la tabla de h de MANDEL ver anexo A.

b) Calculo del estadístico de la consistencia dentro del laboratorios, K

Primero calcular la desviación estándar combinada dentro de la celda para cada nivel

$$\sqrt{\frac{\sum S_{ij}^2}{p_j}} \quad (1.6)$$

Luego calcular para cada laboratorio dentro de cada nivel.

$$K_{ij} = \frac{S_{ij} \sqrt{p_j}}{\sqrt{\sum S_{ij}^2}} = \frac{S_{ij}}{\sqrt{\frac{\sum S_{ij}^2}{p_j}}} \quad (1.7)$$

s : Estimación de una desviación estándar.
 p : Número de laboratorio.
 Símbolos utilizados como subíndice.
 i: Identificador de un laboratorios en particular.
 j: Identificador de un nivel particular.

Graficar los valores de K_{ij} para cada celda en orden de laboratorio, en grupos para cada nivel y comparar con los límites de K al 1% y 5% que se encuentran en la tabla de K de MANDEL en el anexo A para determinar los posibles valores rezagados, erráticos o atípicos.

El análisis de los gráficos de h y K puede indicar que laboratorios específicos presentan patrones de resultados que son marcadamente diferentes de los otros en el estudio. Esto es indicado por una variación dentro de las celdas que pueden ser alta, baja y/o medias de celdas extremas en mucho niveles. En base a los resultados obtenidos, el experto podría:

- i. Conservar los datos del laboratorio por el momento;
- ii. Pedir al laboratorio que vuelva a hacer la medición (si es posible);
- iii. Retirar del estudio los datos del laboratorio.

1.4.3.3 Técnicas numéricas para dar validez a los resultados

Se utiliza dos pruebas para este propósito:

a) Prueba de Cochran

Dado un conjunto de desviaciones estándar s de p laboratorios, todas calculadas a partir del mismo número (n) de resultados replicados, la estadística de la prueba de Cochran, C es:

$$C = \frac{S_{\max}^2}{\sum_{i=1}^p S_i^2} \quad (1.8)$$

C : Estadística de la prueba de Cochcan.
 Smax : La desviación estándar máxima en el grupo
 p : Número de laboratorio.
 Símbolos utilizados como subíndice.
 i: Identificador de un laboratorios en particular.

Se analizan por separado cada desviación estándar que sea sospechosa de inconsistencia a través de una visión grafica de la estadística K de MANDEL. Esta

prueba se utiliza para verificar que de acuerdo a las variancias máximas evaluadas, el o los laboratorios a los que corresponde son valores críticos para la prueba de Cochran. La prueba recomendada de Cochran se aplica para identificar valores rezagados y erráticos o atípicos. Los valores críticos teóricos se encuentran en el anexo A.

- i. Si la estadística de la prueba es menor o igual a su valor critico de 5%, el ítem probado es aceptado como correcto;
- ii. Si la estadística de la prueba es mayor que su valor critico de 5% y menor o igual a su valor critico de 1%, al ítem probado se le denomina rezagado
- iii. Si la estadística de la prueba es mayor que su valor critico de 1%, al ítem probado se le denomina valor estadístico errático o atípico.

b) Prueba de Grubbs.

Una observación errática o atípica.

Dado un conjunto de datos x_i para $i=1, 2, 3, \dots, p$. dispuestos en orden ascendentes, determinar si la observación más grande es un valor errático o atípico utilizando la prueba de Grubbs, calcular la estadística de Grubbs, G_p

$$G_p = \frac{(x_p - \bar{x})}{s} \quad (1.9)$$

Dónde:

$$\bar{x} = \frac{1}{p} \sum_{i=1}^p x_i \quad (1.10)$$

y :

$$s = \sqrt{\frac{1}{p-1} \sum_{i=1}^p (x_i - \bar{x})^2} \quad (1.11)$$

\bar{x} : Media.

s : Estimado de una desviación estándar.

x_1 : Menor valor de todos los datos.

Para probar la significación de la observación más pequeña, calcula la estadística de la prueba.

$$G_1 = \frac{(\bar{x} - x_1)}{s} \quad (1.12)$$

La prueba de Grubbs se aplica para identificar valores rezagados y erráticos o llamados también atípicos Los valores críticos teóricos se encuentran en el anexo A.

- i. Si la estadística de la prueba es mayor o igual a su valor crítico de 5%, el ítem probado es aceptado como correcto;
- ii. Si la estadística de la prueba es mayor que su valor crítico de 5% y menor o igual a su valor crítico de 1%, al ítem probado se le denomina rezagado;
- iii. Si la estadística de la prueba es mayor que su valor crítico de 1%, al ítem probado se le denomina aplicar la prueba de Grubbs para dos observaciones erráticas o atípicas⁵.

1.4.4 Homogeneidad.

La homogeneidad de varianzas se realizó con la Prueba de Bartlett que es una técnica numérica que propone dos hipótesis para esta prueba.

Ho: Existe homogeneidad de variancias.

H1: Al menos una variancia es diferente de las demás.

La estadística de la prueba es:

$$X_0^2 = 2.3026 * q/c \quad (1.13)$$

$$q = \left(\left(\sum_{i=1}^p n_i \right) - p \right) \log_{10} * \left(\sum_{i=1}^p (n_i - 1) * S_i^2 \right) / \left(\sum_{i=1}^p n_i - p \right) - \left(\sum_{i=1}^p (n_i - 1) * \log_{10} * S_i^2 \right) \quad (1.14)$$

$$c = 1 + \left[\frac{1}{3(p-1)} \right] * \sum_{i=1}^p (n_i - 1)^{-1} - \left(\sum_{i=1}^p n_i - p \right)^{-1} \quad (1.15)$$

Siendo:

n: número de datos por analistas.

p: número de analistas que participan en la prueba.

S_i^2 : Desviación estándar de cada analista al cuadrado, varianza de cada analista o varianza muestral.

Regla de Decisión: El valor de q es grande cuando hay una gran diferencia entre las variancias muestrales S_i^2 y es igual a cero si todas las S_i^2 son iguales. Por lo tanto se acepta Ho cuando se cumple la siguiente condición⁵:

$$X_0^2 \text{ menor que } X_c^2$$

Donde:

X_c^2 : Es el valor crítico del estadístico con grado de libertad de p-1 y un nivel de significancia de α .

X_0^2 : Es el estadístico calculado.

1.4.5 Precisión.

La precisión es la dispersión que genera un resultado cuando se ensaya varias veces las réplicas pueden ser en condiciones de repetibilidad, reproducibilidad o precisión intermedia y se mide con el resultados de la desviación estándar de repetibilidad (s_r) y Reproducibilidad (s_R).

Desviación Estándar de Repetibilidad (s_r): La desviación estándar de los resultados de una prueba obtenidos bajo condiciones de repetibilidad.

Ésta es una medida de la de dispersión de la distribución de los resultados de prueba bajo condiciones de repetibilidad. Igualmente, la “varianza de repetibilidad” y el “coeficiente de variación de repetibilidad” pueden definirse y utilizarse como medidas de la dispersión de los resultados de una prueba bajo condiciones de repetibilidad.⁸

Desviación Estándar de la Reproducibilidad (s_R): La desviación estándar de los resultados de prueba obtenidos bajo condiciones de reproducibilidad.

Ésta es una medida de la dispersión de la distribución de los resultados de prueba bajo condiciones de reproducibilidad. Igualmente, la “varianza de reproducibilidad” y el “coeficiente de variación de reproducibilidad” pueden definirse y utilizarse como medidas de la dispersión de los resultados de una prueba bajo condiciones de reproducibilidad.⁸ Los cálculos realizados se desarrollaron según las ecuaciones basadas en la norma ISO 5725-2 donde se encuentran las siguientes ecuaciones. Para cada nivel se calcula las siguientes desviaciones.

a) Desviación estándar de repetibilidad a calcular es.

$$s_{rij} = \sqrt{\frac{(n_{ij} - 1) \times s_{ij}^2}{\sum_{i=1}^p (n_{ij} - 1)}} \quad (1.16)$$

b) Desviación estándar entre laboratorios.

$$s_{Lj}^2 = \frac{s_{dj}^2 - s_{rj}^2}{\bar{n}_j} \quad (1.17)$$

Donde:

$$s_{dj}^2 = \frac{1}{p-1} \sum_{i=1}^p n_{ij} (\bar{y}_{ij} - \bar{y}_j)^2 \quad (1.18)$$

Para:

$$\bar{n}_j = \frac{1}{p-1} \left(\sum_{i=1}^p n_i - \frac{\sum_{i=1}^p n_i^2}{\sum_{i=1}^p n_i} \right) \quad (1.19)$$

c) Desviación estándar de reproducibilidad es.

$$s_R = \sqrt{s_r^2 - s_L^2} \quad (1.20)$$

Dónde:

s_r : Desviación estándar de repetibilidad.

s_R : Desviación estándar de reproducibilidad

s_L : Desviación estándar entre laboratorios.

s_d : Cálculo.

n : número de repeticiones en un laboratorios en un nivel.

Símbolos utilizados como subíndice:

j : Identificador de un nivel en particular

i : Identificador de un laboratorio en particular.

p : número de laboratorios participantes.

n_j : Cálculo

d) Desviación Estándar Relativa. (RSD)

Es medido con el coeficiente de variabilidad o desviación estándar relativa, que son definidos y utilizados como medidas de la dispersión de resultados de ensayo en condiciones de repetibilidad o de reproducibilidad.

$$RSD = (s/m) * 100 \% \quad (1.21)$$

s : Desviación estándar.

m : Media.

Tabla 1.1 Grado de Variabilidad.

RSD	Variabilidad.
$0 < \text{RSD} < 10\%$	Datos homogéneos.
$10\% < \text{RSD} < 15\%$	Datos regularmente homogéneos.
$15\% < \text{RSD} < 20\%$	Datos regularmente variables.
$20\% < \text{RSD} < 25\%$	Datos Variables.
$\text{RSD} \geq 25\%$	Datos muy variables.

El coeficiente de variabilidad es especialmente útil cuando se desea comparar variabilidad de diferentes poblaciones o muestras de la misma población bajo condiciones diversas como repetibilidad y reproducibilidad, dado que no se cuenta con una unidad de medida especificada al expresar la desviación estándar como porcentaje de sus respectivos promedios⁵

- e) Límite de Repetibilidad r : El valor menor o igual a aquél de la diferencia absoluta entre dos resultados de prueba individuales, obtenidos bajo condiciones de repetibilidad, el cual se espera con una probabilidad de 95%. El límite de la repetibilidad se da por la fórmula:

$$r = t_{\infty} \times \sqrt{2} \times s_r \quad (1.22)$$

Donde t_{∞} es el valor de t de Student en dos sentidos para $v = \infty$ a una confianza dada (el nivel de confianza normal establecido es de 95% cuyo valor es 1,96), y s_r es la desviación estándar medida bajo condiciones de repetibilidad⁸ pero si se cambia la s_r por DRS_r se obtiene el límite de repetibilidad relativa.

- d) Límite de Reproducibilidad R : El valor menor o igual a aquél de la diferencia absoluta entre dos resultados de prueba individuales, obtenidos bajo condiciones de reproducibilidad, el cual se espera con una probabilidad de 95%. El límite de la reproducibilidad se da por la fórmula:

$$R = t_{\infty} \times \sqrt{2} \times s_R \quad (1.23)$$

Donde t_{∞} es el valor de t de Student de dos colas para $v = \infty$ a una confianza dada (el nivel de confianza normal establecido es de 95% cuyo valor es 1,96), y s_R es la desviación estándar medida bajo condiciones de reproducibilidad.⁸ al reemplazar en la ecuación 1.23 s_R por DRS_R se obtiene el límite de reproducibilidad relativa.

1.4.6 La Linealidad.

Correlación: Estudia la dependencia estadística entre variables aleatorias equivalentes mediante el estudio de una muestra para valores de x e y, estimando el grado de dependencia y los intervalos de confianza.

Linealidad: Es la capacidad de un método de análisis para producir resultados que son directamente o por una transformación matemática definida, proporcional a la concentración del compuesto en estudio, dentro de un intervalo de concentración establecido.

La linealidad se expresa usualmente en términos de la variancia alrededor de la pendiente de la linealidad de regresión, ajustada por mínimos cuadrados, de acuerdo con la relación matemática establecida para los datos obtenidos por el análisis de muestra con concentraciones crecientes del compuesto. La recta presenta regresión, linealidad y debe ser convergente al origen; estos atributos deben ser evaluados estadísticamente. El análisis de variancias constituye el mejor evaluador de la regresión y de la linealidad. Además debe realizar una prueba para demostrar la convergencia al origen

Modelo Estadístico:

$$Y = \alpha + \beta x + \varepsilon \quad (1.24)$$

Donde:

α : Intercepto

β : Pendiente

ε : Efecto aleatorio de error

El análisis estadístico y los criterios de aceptación para evaluar la regresión lineal, el desvío de la linealidad, la convergencia al origen y los límites de confianza para la recta incluyen las siguientes pruebas de hipótesis.

a) Prueba de hipótesis de la pendiente

Intervalo de confianza para la pendiente.

$$S_b = \sqrt{\frac{S_{xy}^2}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{N}}} \quad (1.25)$$

$$S_{xy}^2 = \frac{\sum y^2 - (a) \sum y - (b) \sum xy}{N - 2} \quad (1.26)$$

$$IC_{(\beta)} = b \pm t * S_b \quad (1.27)$$

β : Valor del parámetro pendiente.

b : Valor estimado de la pendiente.

S_b : Desviación estándar de la pendiente.

S_{xy}^2 : Varianza de la desviación alrededor de la regresión o error de la regresión.

t : Valor de la tabla de t de estudiantes para una probabilidad de error $1-\alpha/2$ y N-2 grados de libertad.

N: número total de respuestas $N= m \times k$

m : Número de réplicas para cada concentración

k : Número de concentraciones.

Ho: $\beta = 0$

Ha: $\beta \neq 0$

Criterio de aceptación: b debe diferir significativamente de cero.

$$b = S_{xy}/S_{xx} \quad (1.28)$$

$$t_b = b - \beta/S_b \quad (1.29)$$

Si $|t_b| > t$, para $\alpha = 0.05$ y (n-2) gl, se rechaza la hipótesis planteada, es decir, que la pendiente difiere significativamente de cero.

b) Prueba de hipótesis para demostrar la convergencia al origen.

Intervalo de confianza para α

$$S_a = \sqrt{S_b^2 * \frac{\sum X^2}{N}} \quad (1.30)$$

$$C(\alpha) = a \pm t * S_a \quad (1.31)$$

α = valor del parámetro del intercepto.

a = valor estimado del intercepto

S_a = desviación estándar del intercepto

t = valor de la tabla t de Student para una probabilidad de error $1-\alpha/2$ y N-2 grados de libertad.

Ho: $\alpha = 0$

Ha: $\alpha \neq 0$

Si $|t\alpha| < t$ para un nivel de significancia igual a 0.05 y n-2 grados de libertad, no se rechaza la hipótesis nula, es decir que el valor de α no es significativamente diferente de cero, pasando por el origen.

Criterio de aceptación: a no debe diferir significativamente de cero.

$$t_a = (a) - \alpha/S_a \quad (1.32)$$

c) Prueba de Hipótesis para el coeficiente de correlación (r)

Ho: $r = 0$ (No existe correlación entre X e Y)

Ha: $r \neq 0$

Criterio de aceptación: r debe diferir significativamente de cero

$$S_r = \sqrt{(1 - r^2)/(N - 2)} \quad (1.33)$$

$$t_r = r/S_r \quad (1.34)$$

Si $|t_r| > t$ para un nivel de significancia igual a 0.05 y $n-2$ grados de libertad, se rechaza la hipótesis planteada, es decir, que existe un grado de asociación entre la concentración y la respuesta que difiere de cero.⁷

d) Prueba de Hipótesis para demostrar regresión y desvío de linealidad.

Para demostrar que la concentración de un compuesto influye en el resultado del ensayo y que esta relación es lineal, se realiza el análisis de variancia para la regresión lineal (relación F), el cual evalúa todas las fuentes (dentro de las respuestas para una misma concentración-replica y entre las diferentes concentraciones). La variación entre concentraciones corresponde a la variancia de la regresión y la variación dentro de concentraciones corresponde a la variancia debida al desvío de la linealidad. Si en el análisis de variancia para la regresión lineal, el valor F calculado para el desvío de linealidad es menor que el valor F de la tabla en las condiciones establecidas, se demuestra que no hubo desviación significativa de la linealidad y si el valor F calculado para la regresión es mayor que el F de tabla, en las condiciones preestablecidas, se demuestra que la regresión es significativa¹⁴.

Cálculos previos: Suma de cuadrados de la regresión.

$$SC_r = \frac{(S_{xy})^2}{S_{X^2}} \quad (1.35)$$

Suma de cuadrados del error puro.

$$SC_{ep} = \sum Y^2 - \frac{\sum Y^2}{mi} \quad (1.36)$$

Suma de cuadrados entre concentraciones.

$$SC_{ec} = \frac{(\sum Y_j)^2}{mi} - \frac{(\sum Y)^2}{N} \quad (1.37)$$

Suma de cuadrados para desvío de linealidad.

$$SCI = SC_{ec} - SC_r \quad (1.38)$$

Donde:

Fc: Valor de F calculado

F α (t, n, x): Valor F de tabla, para un grado de libertad, para el numerador y (n-k) grados de libertad en el denominador en el caso de la regresión y (k-2) grados de libertad para el numerador y (n-k) grados de libertad para el denominador en el caso de linealidad, para $\alpha = 0.05$

Criterio de aceptación:

Si Fc > Ft para la regresión, entonces se concluye que la regresión es estadísticamente significativa, es decir, que la variable concentración está influyendo de manera significativa sobre el resultado del ensayo.

p-valor o probabilidad $\leq \alpha$ existe diferencias significativas.

Si Fc < Ft para la linealidad, entonces se concluye que la falta de ajuste no es significativa y que la relación existente entre ambas variables es lineal.

p-valor o probabilidad > α no existe diferencias significativas ⁷.

Intervalo de confianza para la recta.

$$IC(Y) = \bar{y} \pm t \cdot S_{xy} \quad (1.39)$$

t: valor de t de Student de la n tabla para $\alpha = 0.05$ y (N-1) grados de libertad

\bar{y} : Valor de respuesta encontrado por ajuste por mínimos cuadrados para el valor X_i.

1.4.7 Límite de Detección (LD) y Límite de cuantificación (LC).

a) Límite de Detección: Es la concentración del analito proveniente de la media más pequeña que puede ser detectada con la certeza razonable mediante un procedimiento analítico.

En términos generales, el LD de un analito se puede describir como aquella concentración que proporciona una señal en el instrumento significativamente diferente de la señal del “blanco” o “ruido de fondo”. Sin embargo, va en aumento la tendencia a definir el límite de detección como la concentración de analito que proporciona una señal igual a la señal del blanco, más tres veces la desviación estándar del blanco.

$$LD = Y_b + (3) * S_b \quad (1.40)$$

b) Límite de Cuantificación: El valor verdadero de la señal o concentración del analito que conducirá a estimaciones (o medias) con una desviación estándar relativamente especificada.

LC es considerado como el límite inferior para medidas cuantitativas precisas, como opuesto a la detección cualitativa. Un valor de LC ha sido sugerido para este límite, si bien no se utiliza mucho.¹⁵

$$LC = Y_b + (10) * S_b \quad (1.41)$$

Dónde:

Y_b : El valor de Y para una concentración de cero ($x=0$) es decir es igual al intercepto

S_b : es la desviación del blanco o de contrario se deberá realizar lecturas en puntos cercanos al blanco.

1.4.8 La Sensibilidad.

a) Sensibilidad.

Es la variación en la indicación de un instrumento de medición dividido por el correspondiente cambio del estímulo de lo que se está midiendo.

$$\text{sensibilidad} = \frac{\Delta y}{\Delta x} \quad (1.42)$$

El concepto de sensibilidad sea definido o expresado de diferentes formas. La definición aceptada por la IUPAC (International Union of Pure and Apply Chemistry) es la sensibilidad de la calibración que está definido por la pendiente de la curva de la calibración, así un método es sensible si pequeños cambios en la concentración del analito produce cambios grandes en la medición analítica.

b) Sensibilidad analítica:

Debido a que la sensibilidad de calibrado es independiente de la concentración, solo es igual a m y no tiene en cuenta la precisión, se ha introducido el concepto de sensibilidad analítica que se define como aquella sensibilidad equivalente a la de calibrado dividida por la desviación estándar de las respuestas.

$$\gamma = \frac{m}{S_y} \quad (1.43)$$

γ : Sensibilidad analítica.

m : Pendiente de una curva de calibración.

S_y : Desviación estándar de las señales.

En el caso si se trata de evaluar comparativamente dos métodos, se puede hacer una evaluación de la sensibilidad analítica del método, mediante el siguiente estimado

$$m/S_y \quad (1.44)$$

Donde m y S_y son los datos que provienen de la regresión lineal.

De tal manera que cuanto mayor sea este cociente mayor será la sensibilidad que tendrá el método. Se considera que para dos métodos de igual precisión, el que tenga mayor pendiente en la curva de calibración, será el más sensible. Para dos métodos que tienen curvas con igual pendiente el más sensible es el que tiene mayor precisión.²⁰

1.4.9 La Selectividad.

La selectividad es el grado en que un método puede cuantificar o cualificar al analito en presencia de interferentes. Estos interferentes normal o frecuentemente se encuentran en la matriz de interés. La prueba de selectividad puede diseñarse de acuerdo al método, en el caso de cromatografía la resolución entrega información sobre la selectividad del método, en el caso de espectrofotometría el espectro de absorción o un espectro de masas entrega información al respecto, en especial cuando es comparado en presencia de una interferencia. Una prueba de selectividad comúnmente utilizada, consiste en analizar un mínimo de tres testigos reactivos, tres blancos de matriz y tres muestras o estándares de concentración conocida del analito de interés. Se deben comparar las lecturas (señales de medición) obtenidas para cada caso, y observar si existen variaciones entre los testigos reactivos, blancos de matrices y estándares o muestras con analito. Si se encuentran diferencias significativas deberán ser identificadas y en lo posible eliminadas.¹⁰ Las muestras (harina de pescado o conserva de pescado) tienen una composición en gran parte conocida, son productos manufacturados. La posibilidad de disponer de

muestras con ausencia de analito (Hm) ayuda en estas ocasiones a detectar las posibles interferencias. La aproximación más general consiste en la aplicación de una técnica de separación que permita la segregación de la interferencia o del analito. En este contexto las técnicas cromatográficas, que con llevan una separación previa a la medida de la señal analítica son inherentemente más selectivas que otras técnicas analíticas, especialmente si la detección presenta una selectividad elevada.

Matriz: Es el tipo de sustancia compuesta (liquida, sólida, gaseosa) que puede o no contener al analito de interés, ejemplo: matriz de alimento, matriz ambiental, etc.

Blanco matriz: Matriz que no contiene el analito de interés u objetivo para el método seleccionado.

Blanco de método o Testigo reactivo: Es la solución que contiene todos los reactivos usados en los mismos volúmenes y concentraciones, que son utilizados en el procesamiento de la muestra. Este blanco debe seguir todos los pasos indicados en la técnica y ayuda a detectar trazas de contaminación provenientes del material o reactivos usados.

Ensayo: Operación técnica realizada de acuerdo a un procedimiento específico, que consiste en la determinación cualitativa y/o cuantificación de una o más características (propiedades o analitos) en un determinado producto, proceso o servicio.

Resolución: Parámetro cromatográfico que permite determinar la capacidad de separación entre dos picos, de manera que se puedan diferenciar adecuadamente en el cromatograma los analitos de interés¹⁰.

Comparación de dos medias experimentales.

Para contrastar $H_0: \mu_1 = \mu_2$ cuando no puede suponerse que las dos muestras proceden de poblaciones con desviación estándar iguales, se calcula el estadístico t donde

$$t = \frac{(\bar{x}_1 + \bar{x}_2)}{\left(\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}\right)} \quad (1.45)$$

$$\text{con grado de libertad} = \frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}\right)^2}{\left[\frac{s_1^4}{n_1^2(n_1-1)} + \frac{s_2^4}{n_2^2(n_2-1)}\right]} \quad (1.46)$$

Redondeándose el valor obtenido a un número entero¹⁵.

1.4.10 El rango.

El rango dinámico es también el rango de aplicabilidad de la técnica. Al rango dinámico se le considera que va desde la menor concentración detectable (el LD) hasta la pérdida de relación entre la respuesta y la concentración. En la zona de pérdida de la linealidad, podría aplicarse en principio un método de regresión polinómica para la calibración (o algún otro de naturaleza no lineal), de modo que nada impide que dicha zona sea utilizada con propósitos predictivos.

1.4.10.1 Rango lineal.

Se considera que el rango lineal comprende desde la menor concentración que puede medirse (el LC) hasta la pérdida de la linealidad. Una manera conveniente de medir el cumplimiento de la linealidad es a través de la relación que existe entre la variancia de la regresión, medida por $(S_{x/y})^2$ y la del ruido instrumental, medida por $(S_y)^2$. Si la primera es significativamente mayor que la segunda, se supone que hay causas de desvío de la ley lineal que son estadísticamente superiores al ruido en la respuesta. Para emplear esta prueba es esencial que se cumpla el supuesto bajo el cual se realiza el ajuste lineal, esto es, que los errores en concentración de calibrado sean menores que en respuesta. De lo contrario, se acumularían en $(S_{x/y})^2$ incertidumbres derivadas de la imprecisión en las concentraciones de los patrones, que nada tienen que ver con el ruido instrumental o las pérdidas de la linealidad. La prueba estadística que se utiliza para determinar si los datos se ajustan a la ley lineal es la F: en primer lugar se calcula un valor "experimental" de F, dado por:

$$F_{exp} = \frac{(S_{x/y})^2}{(S_y)^2} \quad (1.47)$$

Dónde:

$S_{x/y}$: Es el desvío estándar de los residuos de la regresión lineal.

S_y : Es una medida conveniente del nivel de ruido en la respuesta

p : Es el número de niveles de concentración estudiados en la recta.

r : Es el número de réplicas de cada punto.

m : datos disponibles (o $p \times r$ datos)

Luego se compara este valor con el crítico que se encuentra en tablas de F (de una cola) para $m - 2$ y $m - p$ grados de libertad, y un determinado nivel de confianza, que puedes ser de 95%. Si $F_{exp} < F$, se acepta que los datos se comportan linealmente. Alternativamente, se calcula la probabilidad p-valor asociada a este valor de F_{exp} , y se considera que la prueba de linealidad es aceptada si p-valor $> 0,05$. Esta prueba se describe en detalle en el trabajo de Danzer y Currie.¹⁶

1.4.11 La Robustez.

La robustez es una medida de la efectividad del método analítico. Debe identificarse aquellas etapas del método donde los cambios implicarán efectos severos en el desempeño analítico y evaluar su influencia mediante el uso de pruebas de robustez³.

La prueba de robustez es el estudio intra-laboratorio para estudiar el comportamiento de un proceso analítico cuando se efectúan pequeños cambios en el ambiente y/o en las condiciones de operación, similares aquellas que pudieran surgir en los diferentes ambientes de prueba. La prueba de robustez permite obtener información de los efectos de cambios menores de una manera rápida y sistemática según la AOAC-PMVC. Las pruebas de robustez son aplicadas normalmente para investigar su efecto en la precisión y en la veracidad del método.¹³

1.4.12 Estimación de la Incertidumbre

Acerca de la estimación de la incertidumbre en la medición. Todas las mediciones se ven afectadas por un cierto error. La estimación de la certidumbre de la medición nos dice qué tamaño podría ser el error de medición. Por lo tanto, la estimación de la incertidumbre es una parte importante del resultado reportado. Definición: Incertidumbre de medida es "un parámetro asociado al resultado de una medición, que caracteriza la dispersión de los valores que podrían razonablemente atribuirse al mensurando"

El cliente necesita que junto con el resultado se mencione la incertidumbre del resultado, es importante, por ejemplo, al mirar límites permisibles de concentración. El laboratorio para conocer su propia calidad de la medición y mejorar la calidad requerida.

1.4.12.1 Cálculo de la incertidumbre expandida U:

Una forma común de presentar las diferentes contribuciones a la estimación de la incertidumbre total de medición es utilizar una llamada diagrama de espina de pescado (o de causa y efecto). La reproducibilidad dentro del laboratorio se combina con estimaciones del sesgo del método y del laboratorio. La forma alternativa es construir un diagrama detallado de espina de pescado y calcular, estimar las contribuciones a la incertidumbre individuales. Este enfoque puede resultar muy útil cuando se estudia o cuantifica las componentes. La incertidumbre se ha demostrado, sin embargo, que en algunos casos esta metodología subestima la incertidumbre de medición, en parte porque es difícil incluir todas las posibles contribuciones a la incertidumbre en este tipo de enfoque. Mediante el uso de los datos de validación del método existentes y control de calidad experimentalmente, se maximizará la probabilidad de incluir todas las contribuciones de incertidumbre.²

La estimación de la incertidumbre combinada se obtiene de multiplicar la incertidumbre expandida por el factor de cobertura k (que es dos porque se encuentra a un 95 % el nivel de confianza). La incertidumbre expandida se obtiene de la raíz cuadrada de la suma de cuadrados de todas las contribuciones determinadas en el diagrama causa efecto.

CAPÍTULO 2 : PARTE EXPERIMENTAL.

2.1 Condiciones del Equipo HPLC.

El equipo es un HPLC con bomba cuaternaria y el detector es un espectrofotómetro UV- visible de la marca Perkin Elmer serie 200 funciona con un software Totalchrom la sala donde se encuentra es el laboratorio instrumental orgánica las condiciones de uso son las siguientes.

La fase móvil contiene: metanol, acetonitrilo, y agua, en las proporciones de 60/25/15 v/v/v, la longitud de onda es de 254 nm, la columna es de fase reversa Merck purospher® star RP-18 endcapped de tamaño de partícula de 3 µm y 4 cm con una pre columna de 5 µm, velocidad de flujo es de 1.5 mL por minuto y un volumen de inyección de 10 u se realizó la elución isocrático (fase móvil constante). Solución de lavado 60/40 metanol y agua.

2.1.1 Equipos y Materiales

El Equipo para obtener el agua grado HPLC marca Merck Milli-Q, una balanza analítica marca Mettler Toledo, una centrifuga marca Rotina modelo 300, una estufa marca Memmert, un agitador de muestras, un baño ultrasónico, una bomba de vacío materiales como: tubos de rosca con tapa de 13x100 mL, viales de 24 x 55 mm, matraz de 100 mL, un kitasato de 1L, un filtro con frita y su envase, un gancho, un dispensador para ácidos de 25 mL, gradillas, una espátula, una micro pipetas de 1000uL con tips, filtros de politetrafluoroetileno PTFE de 0.22 um, mangueras y viales de 1.8 mL.

Los reactivos como: El diclorhidrato de histamina 98 % de pureza, el cloruro de dancilo, bicarbonato de sodio, los solventes acetonitrilo, metanol grado HPLC y acetona grado reactivo.

2.1.2 Procedimiento Experimental del Método.

a) En la matriz harina de pescado:

Pesar 0.2 g de harina de pescado, luego se le agregó 10 mL de ácido tricloroacético al 5% se agita por un tiempo de 42 minutos a 400 RPM.

Se deja reposar por 10 minutos luego en tubos de ensayo con tapa roca se realizó la reacción.

Se tomó 250uL de bicarbonato de sodio saturado se agregó 500uL de la muestra extraída y finalmente, se agregó 500uL de cloruro de dancilo al 0.1% en acetona grado HPLC.

Se agitan los tubos y pone a la estufa a 55 °C por unos 60 minutos aproximadamente. Luego de enfriar, se pone a centrifugar por 5 minutos a 3000 RPM.

Se transvasó a los viales a través de un filtro de poro 0.45 µm.

b) En la matriz Conserva de Pescado:

La muestra de conserva es preparada poco antes de iniciar el ensayo se homogenizan varias conservas de diferentes cajas y se le coloca el mismo código con que ingreso a preparación de muestras

Se pesó 10 g de conserva de pescado luego se le agregó 100 mL de ácido tricloroacético al 5%. Se agitó por un tiempo de 42 minutos a 400 RPM.

Se dejó reposar por 10 minutos.

Luego en tubos de ensayo con tapa roca, se realiza la reacción. se toma 250 uL de bicarbonato de sodio saturado. Se agregó 500 uL de la muestra extraída, finalmente, se agregó 500uL de cloruro de dancilo al 0.1% en acetona grado HPLC.

Se agitan los tubos y pone a la estufa a 55 °C por unos 60 minutos. Luego se sigue el procedimiento anterior para harina de pescado.

2.1.3 Cálculo de la concentración.

La concentración de histamina en harina de pescado se expresaron en unidades de mg por Kg o ppm para determinar la concentración de histamina en la muestra, se interpoló el área de la muestra en una curva de calibración llamada concentración de histamina en mg/L vs área del cromatograma los puntos de la curva son ocho desde 0 ppm hasta 5000 ppm

$$Y = (Ax + B) \quad (2.1)$$

$$x = (Y - B)/A \quad (2.2)$$

Se obtuvo el valor de x expresado en ug/mL.

$$H = x * \frac{v}{m} \quad (2.3)$$

Dónde:

x : Concentración de histamina en mg/L

A: Es pendiente de la ecuación de calibración hallada por mínimos cuadrados.

B: Es el intercepto de la ecuación de calibración hallada por mínimos cuadrados.

v : Es el volumen final.

m : Viene a ser la masa de muestra.

H : Concentración de histamina expresada en unidades de ppm o ug /Kg.

Para el cálculo de la concentración de histamina en conserva de pescado en unidades de ppm, se sigue el procedimiento indicado anteriormente, Lo único que cambia es el volumen final que es de 100 mL y el valor del peso de conserva de pescado que es 10 g.

2.2 Proceso de Validación.

El grado de validación corresponde a una validación completa eso significa que se evaluaron todos los parámetros de desempeño sin excepción debido a que el método tuvo modificaciones. Se inició realizando la veracidad luego se desarrolló cada parámetro consecutivamente hasta la estimación de la incertidumbre conservando los requerimientos de cada uno de ellos la primera parte es experimental. Se solicitó un compósito de muestras al área de preparación de muestras donde la muestra paso por el proceso de moler, homogenizar, tamizar y se empaquetó el cual se entregó a cada analista. La segunda parte requiere la evaluación de los resultados obtenidos por cada uno de ellos con la ayuda del programa Excel o minitab según sea el caso estos dos programas tienen los estadísticos necesarios. Para la validación de este método, se necesitaron tres analistas experimentados quienes han pasado por pruebas interlaboratorio con buenos resultados, ellos realizaron todos los parámetros requeridos de manera simultánea o individual según sea las condiciones. Se realizaron dentro de un laboratorio donde se controla la temperatura ambiental, la humedad, se verifican las balanzas, los materiales de vidrio están calibrados y los equipos están verificados y reciben su mantenimiento preventivo.

En un plan de validación fue documentado cada proceso los cromatogramas, curvas de calibración, los cálculos de los resultados y las evaluaciones estadísticas.

2.2.1 Veracidad.

Se realizó un ensayo de recuperación para la determinar la veracidad se preparó un compositor de muestras a la que se le realizó el ensayo de histamina seis réplicas y se obtuvo un promedio de 180 ppm de histamina. Se agregó una concentración conocida a partir de un estándar de histamina de 91.36 mg/L (alícuotas de 0,5; 1; 2; 3; 5 y 8 mL respectivamente) a 0.2 g de harina de pescado y se obtuvo las seis concentraciones de histamina desde el más bajo 228 ppm, 457 ppm, 914 ppm, 1370 ppm, 2284 ppm hasta 3654 ppm, Para la conserva de pescado, se pesa 10 g de muestra y se le adiciona una concentración conocida de histamina a partir de un estándar de histamina 101.51 mg/L (alícuotas de 2.5, 4.0 y 10.0 mL). Las concentraciones adicionadas son de 25, 41 y 102 ppm sobre una muestra que contiene cero ppm de histamina. La veracidad del método se realizó por la técnica de porcentaje de recuperación²³, en donde el porcentaje de recuperación debe ser mayor al 90% teniendo en cuenta la referencias¹⁹.

Se realizó la prueba de ANOVA de un factor a los resultados de porcentajes de recuperación, para poder determinar si existe una media diferente de las demás

medias. Se debe cumplir que F calculado es menor que F crítico para aceptar la hipótesis nula a un 95% de confianza también se debe comprobar que el p -valor sea menor que 0.05.

2.2.2 Prueba de Normalidad.

Para evaluar si los datos generados en la precisión siguen una distribución normal se utiliza la Prueba de Anderson-Darling gráfica. Esta prueba se realiza para conocer que los datos siguen un comportamiento normal para poder aplicar en ellos las pruebas estadísticas. Se graficó los residuos de cada una de las concentraciones de histamina para la harina de pescado y conserva de pescado. Donde, el valor observado y_{ij} menos la media general \bar{y}_i genera residuos ϵ_{ij} que luego son ploteados cercano a la recta en una gráfica. La prueba de normalidad se realizó con el programa minitab. Se propuso las hipótesis siguientes:

Ho: La muestra aleatoria tiene una distribución normal.

H1: La muestra aleatoria no tiene una distribución normal.

Se tiene una regla de decisión: si el p -valor es mayor a 0.05 a un nivel de significancia de 95% se acepta la hipótesis nula Ho.

2.2.3 Ecrutinio de datos para la precisión

El escrutinio de resultados para determinar la consistencia de los valores rezagados, erráticos o atípicos. Lo realizaron los tres analistas designados en todos los niveles de concentración de histamina y conserva de pescado. Esta evaluación se realizó con la finalidad de encontrar datos de la precisión que son atípicos o rezagados con todos los demás datos o son muy alejados del valor de la media. Los datos atípicos se eliminan del análisis a diferencia de los rezagados que queda a criterio del analista su permanencia. Se evaluaron con los siguientes estadísticos: La Prueba de Cochran, la Prueba de Grubbs, Prueba h de MANDEL (Técnica Grafica de la Consistencia entre Laboratorios), Prueba K de MANDEL (Técnica Grafica de la Consistencia dentro de Laboratorios).

2.2.4 Homogeneidad.

Se realizaron los cálculos numéricos en una hoja de excel con la prueba de Bartlett por cada nivel de concentración. Se utilizan los datos de la precisión por nivel de concentración. La homogeneidad se realiza para verificar que los datos obtenidos no tienen varianzas muy diferentes a la varianza media de todos los resultados obtenidos. La prueba de Bartlett es la que se usó para evaluar la homogeneidad y se hallan los valores del estadístico experimental para cada una de las siete concentraciones de histamina y se comparó luego con el estadístico crítico que se

obtuvo de tablas con un valor de grado de libertad correspondiente a dos ($p - 1$) y un alfa de 0.05 o un nivel de significancia de 95%. Prueba de una cola. Se realizó la prueba de Bartlett de manera gráfica también se utilizó el programa minitab para ambas matrices harina de pescado y para conserva de pescado. Los resultados numéricos y el valor crítico se muestran en la tabla siguiente.

2.2.5 Precisión.

La precisión permite conocer si el método tiene capacidad de dar los mismos resultados cuando se ensaya el método en el laboratorio. Se realizó en condiciones de repetibilidad fue en el mismo día, el mismo equipo HPLC, en el mismo laboratorio, los mismos reactivos, cada uno de los analistas realizaron su propia curva de calibración y en condiciones de reproducibilidad lo realizaron tres analistas en tres días diferentes lo que significa que se realiza en condiciones de precisión intermedia para la reproducibilidad. Evaluando la precisión en los siete niveles de concentración de harina de pescado y en los dos niveles de concentración de conserva de pescado. Luego que se evaluaron los resultados obtenidos no existe ningún valor rezagado o atípico, además, los resultados siguen un comportamiento normal y homogéneo. Se procede a determinar la precisión y se hallan la desviación estándar de repetibilidad y de reproducibilidad y también se halló la desviación estándar relativa de repetibilidad y desviación estándar relativa de reproducibilidad y los límites de precisión respectivos las desviaciones obtenidas no deben superar los límites obtenidos para cada uno de ellos.

2.2.6 Pruebas de la linealidad.

Se desarrolló por los tres analistas cada uno preparo dos curvas de manera simultánea y fue leído en un mismo equipo en un mismo día se programaron de forma correlativa en el equipo. La linealidad se desarrolló, porque nos permite dar resultados de histamina reproducibles debido a que se controla la linealidad del método. Con estos límites de confianza hallados para la pendiente, el intercepto de la curva de calibración y las pruebas de regresión y linealidad.

2.2.7 Límite de detección (LD)

El límite de detección del método permitió conocer la menor cantidad de analito que puede detectar el método. Se determinaron usando los datos del análisis de la regresión lineal de las curvas de calibración y fueron verificados mediante la fortificación de los resultados en los valores obtenidos.

2.2.8 Límite de cuantificación (LC)

El límite de cuantificación se realizó a partir de la linealidad por la confirmación de los resultados, realizando la fortificación en harina de pescado a este nivel. El límite de cuantificación nos permite conocer la menor cantidad de analito que cumple que es preciso y verdadero.

2.2.9 Sensibilidad del método.

La sensibilidad del método está determinada por la pendiente de la curva de calibración que se realizó en el capítulo de linealidad.

2.2.10 Selectividad.

La selectividad se desarrolló porque debemos descartar que otros analitos interferentes se encuentren presentes en el proceso del ensayo y en la matriz lo que podría suceder es que la concentración de la histamina se incremente o disminuya. La evaluación de la selectividad del método se realizó de acuerdo a lo siguiente:

a) Como el blanco matriz no está disponible para la harina de pescado se realizarán los siguientes ensayos:

- i. Tres muestra positiva.
- ii. Tres blancos de método
- iii. Tres estándares de calibración correspondiente a la muestra positiva

La concentración del estándar de calibración es cercana o igual que la concentración de la muestra positiva para poder compararlos. Todos los resultados obtenidos se evaluaron para poder ver si existe interferencia (señal) y poder concluir la selectividad en esta matriz.

b) Usando blanco de matriz para conserva de pescado, se realizarán los siguientes ensayos:

- i. Tres blancos de matriz
- ii. Tres blancos de método
- iii. Tres estándares de calibración de concentración baja.

Todos los resultados obtenidos se evaluarán para poder visualizar si existe interferente (señal) en esta matriz. Luego se podrá concluir la selectividad en ambas matriz.

2.2.11 Rango del método.

El rango se determinó con la linealidad de la curva de calibración y el límite de cuantificación calculada. El rango del método se estableció por que al momento de reportar un resultado debe conocerse cuál es el mayor resultado confiable que establece la técnica que se puede reportar y también el menor valor confiable que se puede reportar.

2.2.12 Robustez del método.

La robustez se realizó porque nos permite conocer que parámetros son factores críticos del método. Se inicia con muestras de harina de pescado en siete niveles de concentraciones y muestras de conservas de pescado en dos niveles de concentraciones. Los factores que tendrían una incidencia mayor en la variación de Los resultados de ensayo para un valor por encima de lo establecido como también para un valor por bajo de lo establecido en el método se muestran en la siguiente tabla.

2.2.13 Estimación de la incertidumbre del método.

La estimación de la incertidumbre se realizó porque nos permite conocer el rango donde mi resultado se puede considerar que es exacto.

La estimación de la incertidumbre se realiza, basada en enfoques Top-Down que se encuentra en el Royal Society Chemistry y también en Nordtest Handbook. El material de referencia se reemplaza por una muestra de harina de pescado a la que se le adiciona una cantidad conocida del estándar de histamina. El cálculo del bias entonces se realizó por porcentaje de recuperación para cada concentración de histamina.

a) Mensurando.

Determinación del contenido de Histamina en mili gramos por Kg en productos hidrobiológicos.

b) Identificación de las fuentes de la estimación de la incertidumbre

Las dos contribuciones de la estimación de la incertidumbre se muestran en la siguiente Figura N° 14.1. Las contribuciones del bias se muestran en la figura N° 14.2. Se puede ver en el anexo B.

c) Modelo matemático

$$U = k * uHm \quad (2.4)$$

$$uHm = \sqrt{(uSR)^2 + (ubias)^2} \quad (2.5)$$

$$u(bias) = \sqrt{u(sesgo) + u(CAdi.MR) + (Srec/\sqrt{n})^2} \quad (2.6)$$

$$u(CAdi.MR) = \sqrt{(uWM)^2 + (uP)^2 + (uWE)^2 + (uV1)^2 + (uV2)^2 + (uV3)^2 + (uV4)^2} \quad (2.7)$$

Donde:

U : Estimación de la incertidumbre del resultado de histaminas por nivel.

Hm : Contenido de histamina en la muestra (mg/kg)

u_{SR} : Incertidumbre de reproducibilidad del método (desviación estándar de reproducibilidad de la validación)

u_{bias} : Incertidumbre de la desviación de la recuperación experimental en mg/Kg o ppm

$u(Sesgo)$: Incertidumbre de la diferencia entre la media de la recuperación experimental y la teoría (Rec% - 100%)

$u(S_{rec})$: Incertidumbre de la desviación de la recuperación experimental.

S_{rec} : Desviación estándar de la recuperación experimental.

n: Número de datos que se tiene del porcentaje de recuperación.

CAdi.MR: Concentración adicionada del Material de referencia (histamina)

u_{WM} : Incertidumbre de la masa de la muestra de harina en donde se realiza la adición, g

u_P : Incertidumbre de la pureza del material de referencia de la histamina.

u_{WE} : Incertidumbre del peso del material de referencia de histamina para preparar la solución stock de 1000 mg/L

u_{V1} : Incertidumbre del volumen a cual se diluyo, para preparar la solución de 1000 mg/L

u_{V2} : Incertidumbre del volumen del material de referencia tomado de la solución de 1000 mg/L para preparar la solución de 100 mg/L

u_{V3} : Incertidumbre del volumen (alícuota de 10 mL) a cual se diluyo para preparar la solución de 100 mg/L

u_{V4} : Incertidumbre del volumen tomado de la Solución de 100 mg/L para la adición a la muestra.

d).Cálculo de la estimación de la incertidumbre relativa.

$$\frac{uHm}{Hm} = \sqrt{\left(\frac{uSR}{SR}\right)^2 + u(bias)^2} \quad (2.8)$$

$$u(bias) = \sqrt{\left(\frac{uSesgo}{100}\right)^2 + \left(\frac{u(Srec)}{Rec}\right)^2 + \left(\frac{uCAdi.MR}{CAdi.MR}\right)^2} \quad (2.9)$$

WM: Masa de la muestra original en donde se realizó la adición, g

u_P : Incertidumbre de la pureza del material de referencia.

P : Pureza del material de referencia.

u_{WE} : Incertidumbre del peso del material de referencia para preparar la solución stock de 1000 ug/L

WE: Peso del material de referencia para preparar la solución stock de 1000 ug/L

u_{V2} : Incertidumbre de la alícuota tomada de la solución de 1000 mg/L para preparar la solución de 100 mg/L

V_2 : Alícuota tomada de la solución de 1000 mg/L para preparar la solución de 100 mg/L

u_{V3} : Incertidumbre del volumen (alícuota de 10 mL) a cual se diluyo para preparar la solución de 100 mg/L

V_3 : Volumen de la solución de 100 mg/L

u_{V4} : Incertidumbre de la alícuota tomada de la a solución de 100 mg/L para realizar la adición a la muestra.

V_4 : Alícuota tomada de la solución de 100 mg/L para la adición a la muestra.

$$\frac{u(CAdi.MR)}{(CAdi.MR)} = \sqrt{\left(\frac{uWM}{WM}\right)^2 + \left(\frac{uP}{P}\right)^2 + \left(\frac{uWE}{WE}\right)^2 + \left(\frac{uV1}{V1}\right)^2 + \left(\frac{uV2}{V2}\right)^2 + \left(\frac{uV3}{V3}\right)^2 + \left(\frac{uV4}{V4}\right)^2} \quad (2.10)$$

Donde:

Hm: Contenido de histamina en la muestra original en mg/kg o ppm

u_{SR} : Reproducibilidad del método (desviación estándar de reproducibilidad).

U_{bs} : Incertidumbre de la desviación de la recuperación experimental en mg/Kg o ppm

u_{Sesgo} : Incertidumbre de la diferencia entre la media de la recuperación experimental y la teoría = (Rec% - 100%) 100 % =Valor teórico de la recuperación.

$u(S_{\text{rec}})$: Incertidumbre de la desviación de la recuperación experimental
Rec: Promedio de la recuperación experimental.
 $uC_{\text{Adi.MR}}$: Incertidumbre de la concentración adicionada del material de referencia.
 $C_{\text{Adi.MR}}$: Concentración adicionada del material de referencia.
 uW_M : Incertidumbre de la masa de la muestra original en donde se realizó la adición.

- e) El valor de k es dos al 95 % y se reemplaza en la ecuación 2.4 para obtener la estimación de la incertidumbre por nivel de concentración..
La estimación de la incertidumbre del método se expresa en dos ecuación para todo el rango de concentraciones de Hm en conserva como en harina..

CAPÍTULO 3 : RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

3.1 Veracidad.

Aquí se muestra el cuadro de porcentajes de recuperación para los seis niveles de concentración en las muestras de harina de pescado. Cada uno de los niveles de concentración fue replicado seis veces.

Tabla 3.1 Resultados de los porcentajes de recuperación para las tres primeras concentraciones de Histamina.

Muestra más fortificación ppm	Fortificación Ppm	Muestra pura ppm	% Recuperación
403	228	180	98
420	228	180	105
405	228	180	99
390	228	180	92
392	228	180	93
393	228	180	93
623	457	180	97
613	457	180	95
622	457	180	97
637	457	180	100
621	457	180	97
609	457	180	94
1056	914	180	96
1119	914	180	103
1123	914	180	103
1069	914	180	97
1105	914	180	101
1110	914	180	102

Tabla 3.2 Resultados de los porcentajes de recuperación para las tres últimas concentraciones de Histamina.

Muestra más fortificación Ppm	Fortificación ppm	Muestra ppm	% Recuperación
1588	1370	180	103
1620	1370	180	105
1499	1370	180	96
1526	1370	180	98
1539	1370	180	99
1521	1370	180	98
2546	2284	180	104
2419	2284	180	98
2355	2284	180	95
2380	2284	180	96
2466	2284	180	100
2444	2284	180	99
3809	3654	180	99
3630	3654	180	94
3724	3654	180	97
3804	3654	180	99
3644	3654	180	95
3671	3654	180	96

Los porcentajes de recuperación hallados para las seis concentraciones de histamina en harina de pescado se encuentran en un rango de 92% á 105% como valor mínimo y valor máximo. Estos resultados se encuentran por encima del porcentaje de recuperación de 90% que es la recuperación que menciona. la norma chilena de referencia donde en sus pruebas de recuperación obtuvieron resultados mayores al 90%¹⁹. Esto confirma por comparación que los resultados de porcentajes de recuperación se encuentran dentro del rango esperado tal cual se han realizado en otros laboratorios.

En el caso de la conserva de pescado los porcentajes de recuperación hallados para las tres concentraciones de histamina se encuentran en un rango de 92% á 108 % como valor mínimo y el valor máximo este resultado también se encuentran por encima del porcentaje de recuperación al que hace referencia la norma¹⁹. Esto confirma que los resultados de porcentajes de recuperación se encuentran dentro de lo esperado en la tabla 3.3 se muestran los porcentajes.

Se realizó la prueba de ANOVA de un factor para ambas matrices los resultados se muestran en las siguientes tablas 3.4 y tabla 3.5.

Tabla 3.3 Resultados de los porcentajes de recuperación para los tres niveles de concentraciones de histamina evaluados en las muestras de conserva de pescado, realizando seis replicas por cada uno de los niveles.

Muestra más fortificación ppm	Fortificación ppm	Muestra ppm	% Recuperación
27	25	0	108
25	25	0	100
24	25	0	96
23	25	0	92
25	25	0	100
26	25	0	104
42	41	0	102
42	41	0	102
44	41	0	107
43	41	0	105
43	41	0	105
40	41	0	98
104	102	0	102
102	102	0	100
97	102	0	95
101	102	0	99
104	102	0	102
108	102	0	106

La prueba de ANOVA nos indica que los porcentajes de recuperación son equivalentes en cada uno de los niveles. En la matriz de harina de pescado tabla 3.4 como en la matriz conserva de pescado tabla 3.5 el F calculado, es menor que F crítico por lo que no existe diferencias significativas al 95% de confianza para rechazar la hipótesis nula. Esta prueba permite confirmar el parámetro de veracidad en el método.

Tabla 3.4 Análisis de varianza en porcentaje de recuperación (nivel de confianza de 95%) y análisis de varianza de un factor para la harina de pescado.

% Recuperación en la Harina de Pescado.						
RESUMEN						
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
Nivel I	6	580	96.67	25.07		
Nivel II	6	579	96.50	4.30		
Nivel III	6	602	100.33	9.47		
Nivel IV	6	599	99.83	11.77		
Nivel V	6	592	98.67	10.27		
Nivel VI	6	580	96.67	4.27		
ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	89.89	5	17.98	1.66	0.18	2.53
Dentro de los grupos	325.67	30	10.86			
Total	415.56	35				

Tabla 3.5 Análisis de varianza en porcentaje de recuperación (nivel de confianza de 95%) y análisis de varianza de un factor para la conserva de pescado.

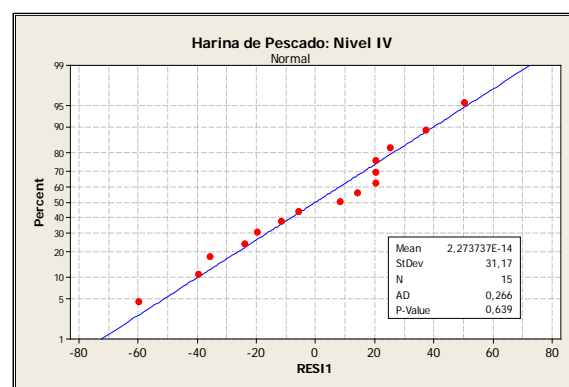
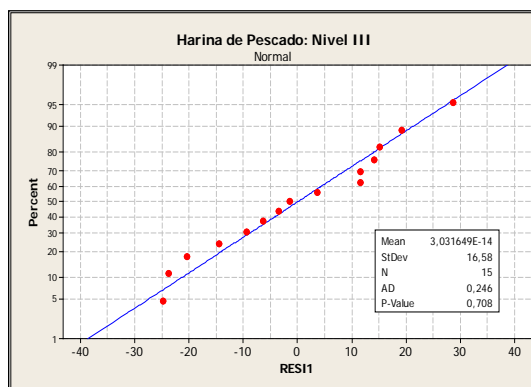
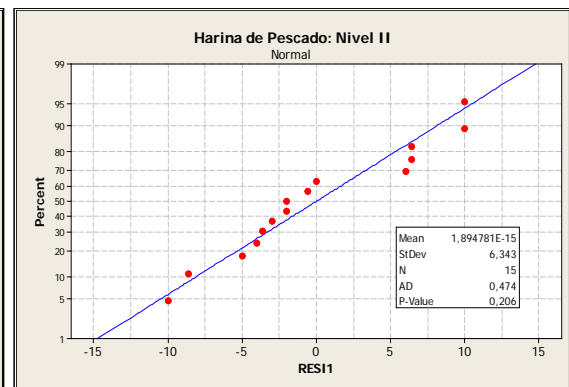
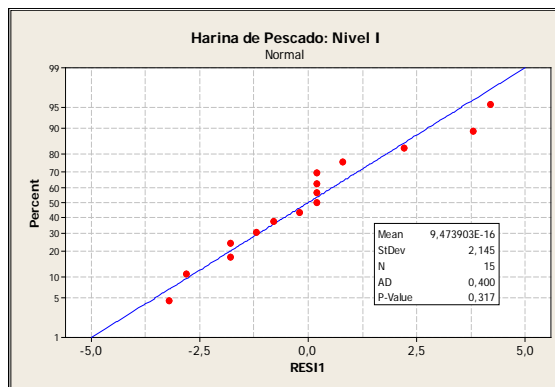
% Recuperación en la Conserva de Pescado.						
RESUMEN						
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
Nivel I	6	600	100	32		
Nivel II	6	619	103.17	10.17		
Nivel III	6	604	100.67	13.47		
ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	33.44	2	16.72	0.90	0.43	3.68
Dentro de los grupos	278.17	15	18.54			
Total	311.61	17				

3.2 Prueba de Anderson Darling.

Tabla 3.6 Valores de p-valor obtenidos de la evaluación de la prueba de normalidad a cada una de las siete concentraciones de histamina en harina de pescado.

Concentración de histamina (ppm)	p-valor	p-valor al 95 %
59	0.317	0.05
182	0.216	0.05
512	0.708	0.05
1018	0.639	0.05
2207	0.485	0.05
3332	0.832	0.05
4434	0.204	0.05

Los valores de p-valor obtenidos son mayores al p-valor al 95% de confianza por lo que se puede concluir que los valores son normales para cada una de los siete niveles de concentraciones de harina de pescado y dos niveles de concentraciones de conserva de pescado.



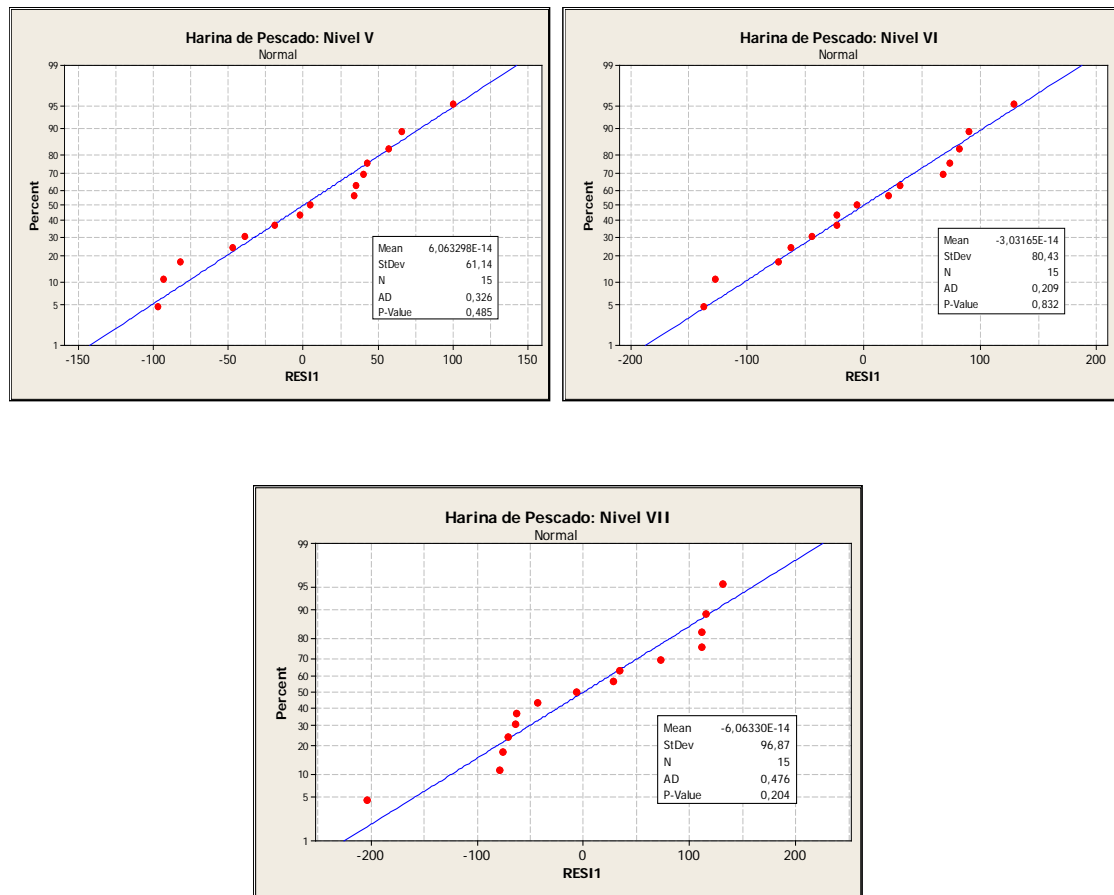


Figura 3.

Se muestra los gráficos de normalidad evaluados en el programa minitab para las siete concentraciones de histamina en harina de pescado

De los gráficos obtenidos para determinar la normalidad para los siete niveles de concentración de histamina, se observan la diagonal principal representa a la distribución normal teórica. De ella se puede observar que los residuos se ajustan a esta diagonal. En ninguno de los gráficos aparecen desviaciones entre ambas distribuciones o algún punto muy alejado el que se consideraría atípico. .

Tabla 3.7 Valores de p-valor obtenidos de la evaluación de La Prueba de normalidad de las dos niveles de concentraciones de histamina en conserva de pescado.

Concentración de Histamina (ppm)	p-valor	p-valor al 95 %
11	0.138	0.05
29	0.326	0.05

Los valores de p-valor obtenidos son mayores al p-valor al 95% de confianza por lo que se puede concluir que los valores son normales para los dos niveles de concentración de conserva de pescado.

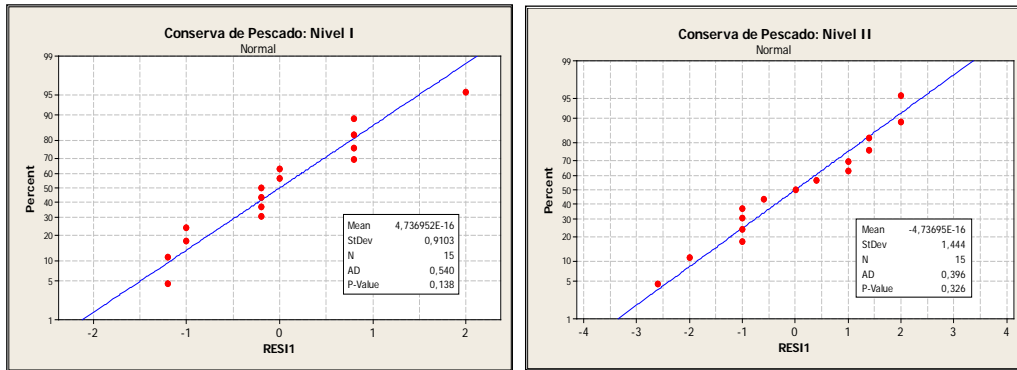


Figura 4

Se muestra los gráficos de normalidad evaluados en minitab para los dos niveles de concentraciones de histamina en conserva de pescado.

Donde los residuos de dispersan en toda la diagonal teórica mostrando un comportamiento normal.

3.3 Escrutinio de datos.

En las tabla 3.8. y tabla 3.9 se muestran las cinco replicas por nivel de concentración realizadas por cada analista.

Tabla 3.8 Resultados de precisión de la Histamina (ppm) en conserva de pescado para los dos niveles de concentración.

Analistas	Réplicas (ppm)				
	1	2	3	4	5
A	10	11	10	11	13
B	11	10	10	11	9
C	12	12	11	11	10
A	29	30	27	31	28
B	30	27	29	27	27
C	28	31	32	32	30

Tabla 3.9 Resultados de precisión de la histamina (ppm) en harina de pescado para los siete niveles de concentración

Analista	Réplicas					Promedio (ppm)
	1°	2°	3°	4°	5°	
A	61	65	59	58	61	61
B	57	59	58	59	61	59
C	55	58	57	59	62	58
A	177	185	192	182	192	186
B	192	188	178	180	172	182
C	175	187	177	172	174	177
A	525	533	515	501	533	521
B	491	534	529	530	490	515
C	528	496	485	490	498	499
A	1065	1034	1060	980	1060	1040
B	1053	980	1024	992	1030	1016
C	988	1050	980	1020	960	1000
A	2282	2313	2290	2150	2200	2247
B	2291	2172	2152	2231	2109	2191
C	2090	2240	2188	2181	2217	2183
A	3363	3259	3460	3380	3468	3386
B	3210	3363	3341	3250	3200	3273
C	3201	3360	3370	3294	3468	3339
A	4252	4587	4484	4572	4385	4456
B	4304	4480	4402	4362	4292	4368
C	4399	4551	4589	4435	4415	4478

Los resultados de la estadística de consistencia h de MANDEL y K de MANDEL para todos los niveles de concentración ordenados en forma creciente para la matriz harina de pescado se presentan en la tabla 3.10 que se muestra a continuación.

Tabla 3.10. Resultados de h y K de MANDEL en los niveles de concentración de histamina en harina de pescado

Analistas	h	K
A	1.13	1.16
B	-0.34	0.64
C	-0.78	1.12
A	0.94	0.95
B	0.12	1.16
C	-1.05	0.86
A	0.84	0.76
B	0.26	1.24
C	-1.1	0.94
A	1.06	1.06
B	-0.13	0.88
C	-0.93	1.05
A	1.15	1.05
B	-0.46	1.08
C	-0.69	0.87
A	0.94	0.98
B	-1.05	0.86
C	0.11	1.14
A	0.38	1.34
B	-1.13	0.73
C	0.76	0.82

En la Tabla 3.10 se observa que los valores de h de MANDEL obtenidos son menores al valor críticos h de MANDEL al 1 % que es 1.15 ($p = 3$) como al valor críticos h de MANDEL al 5% que es de 1.15 ($p = 3$) según tablas y los valores de K obtenidos son menores al valor critico K de MANDEL al 1% que es 1.53 ($n = 5$) como al valor critico K de MANDEL 5% que es 1.40 ($n = 5$) según la tabla. Se acepta que no hay valores atípicos entre los datos de los analistas y dentro de los datos de cada analista. Donde p es el número de analistas debido a que se realiza dentro de un laboratorio y no con varios laboratorios. Donde n es número de réplicas realizadas.

Tabla 3.11 Resultados de h y K de MANDEL en los dos niveles de concentración de histamina en conserva de pescado.

Analistas	H	K
A	0.33	1.27
B	-1.12	0.61
C	0.79	1.01
A	-0.1	0.95
B	-0.94	0.93
C	1.05	1.11

En la Tabla 3.11 se observa que los valores obtenidos de h de MANDEL son menores al valor críticos h de MANDEL al 1 % que es 1.15 y al valor críticos h de MANDEL al 5% que es 1.15 y los valores de K calculado son menores al valor critico K de MANDEL al 1% que es 1.53 como al valor critico K de MANDEL al 5% que es 1.40 respectivamente. Se acepta que no hay valores atípicos entre analistas y dentro de los datos de cada analista en la matriz conserva de pescado.

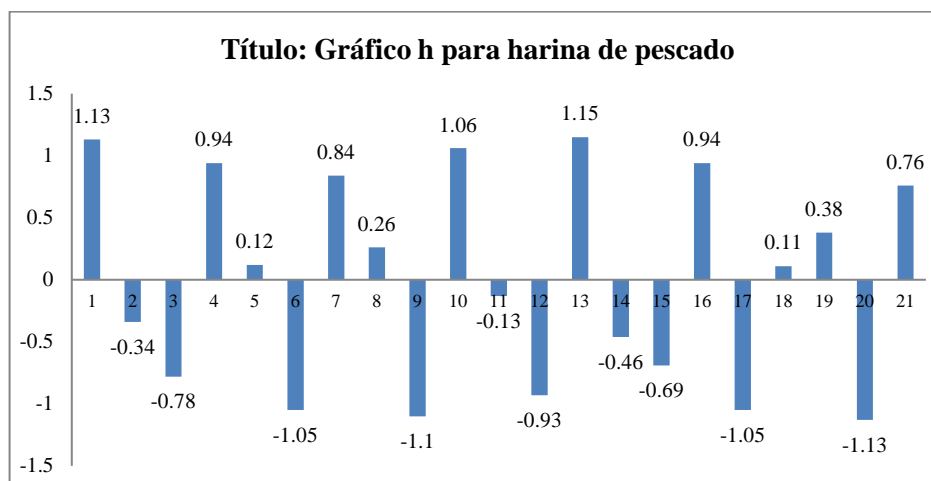


Figura 5
Cálculo de h de MANDEL.

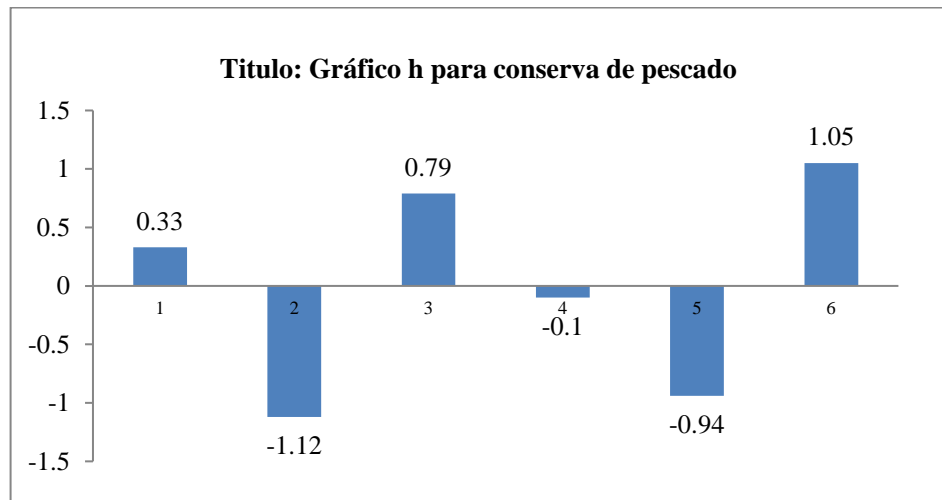


Figura 6
Cálculo h de MANDEL para conserva de pescado

Según las Figura 5 y Figura 6 se muestran, los valores de h obtenidos, se observa que los resultados no sobre pasan el valor límite al 5 % que es de 1.15 y al 1% de confianza que es 1.15 como lo indican en la tabla para $p = 3$, para harina de pescado y para conserva de pescado.

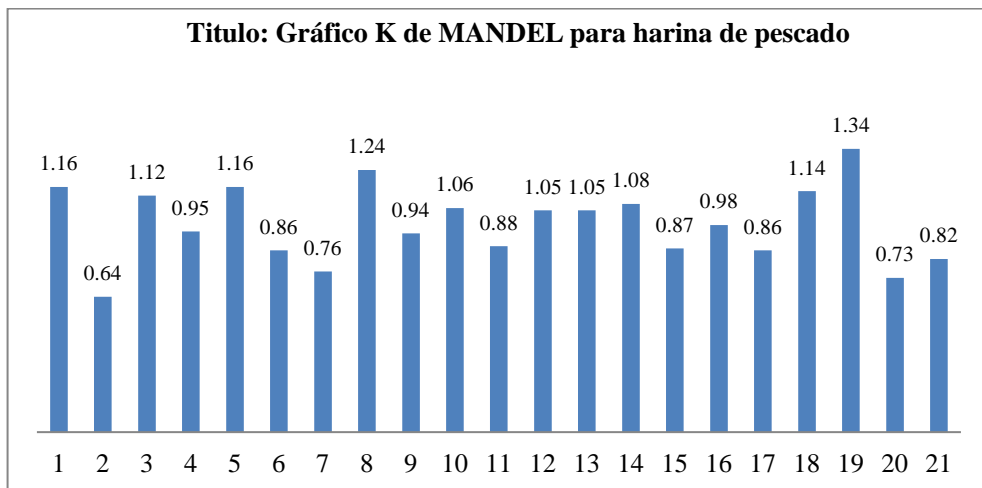


Figura 7
Cálculo K de MANDEL para harina de pescado

Según la Figura 7 se muestran, los valores de K de MANDEL calculados, se observa que los resultados no sobre pasan el valor límite. Por lo tanto, se mantienen por debajo del porcentaje del 5 % que es 1.40 y del 1% que es 1.53 como lo indican en la tabla para $n = 5$ y $p = 3$

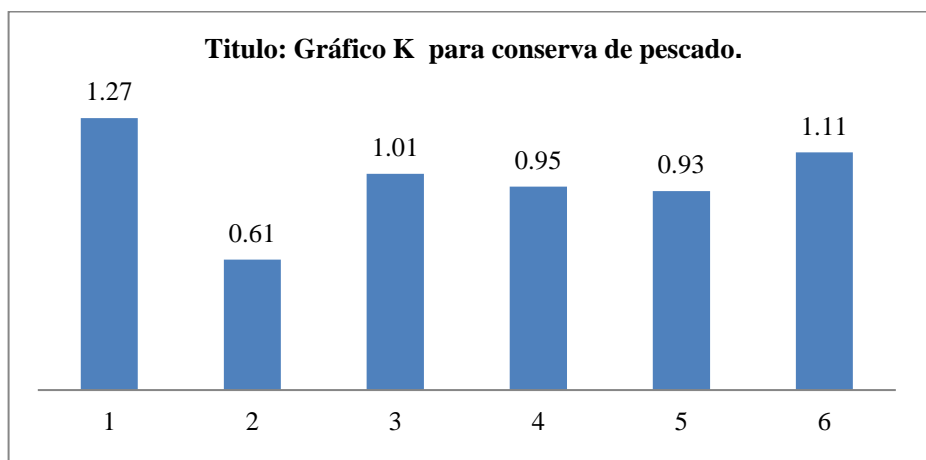


Figura 8
Cálculo K de MANDEL para conserva de pescado

Según la Figura 8 se muestran los valores de K de MANDEL, se observa que los resultados no sobre pasan el valor límite. Por lo tanto, se mantienen por debajo del porcentaje del 5% que es 1.40 y del 1% que es 1.53 como lo indican en la tabla para $n = 5$ y $p = 3$. Examinando los gráficos h y K de MANDEL, y comparándolos con los indicadores de ambos estadísticos, se observó que todas las medidas de los distintos analistas están por debajo del valor crítico del 1% lo cual indica que no hay datos atípicos para ambas matrices.

a) La prueba numérica para dar validez a los resultados (Prueba de Cochran)

Tabla 3.12 Resultados de Cochran para los siete niveles de concentración de histamina en harina de pescado para el analista A, B y C

Promedio de A, B y C por nivel (ppm)	59	182	512	1018	2207	3332	4434
Estadístico de Cochran calculados	0.447	0.451	0.515	0.372	0.386	0.432	0.594

En la tabla 3.12 se muestra que el valor de Cochran calculado es menor que el valor crítico de Cochran al 1% de confianza que es de 0.834 como lo indican en la tabla para $n = 5$ y $p = 3$ por lo que se acepta que no hay ningún valor rezagado.

Tabla 3.13 Resultados de Cochran para los dos niveles de concentración de Histamina en conserva de pescado.

Promedio Analista	Estadístico de Cochran calculado
11	0.538
10	
11	
29	0.41
28	
31	

Tabla 3.14 Evaluación de Grubbs para los resultados de histamina en harina de pescado para los analistas A, B y C

Promedio Analista.	Estadístico de Grubbs calculado.
61	1.13 máx.
59	
58	0.78 min
186	0.94 máx.
182	
177	1.05 min
521	0.84 máx.
515	
499	1.10 min
1040	1.06 máx.
1016	
1000	0.93 min
2247	1.15 máx.
2191	
2183	0.69 min
3386	0.94 máx.
3273	
3339	1.05 min
4456	0.76 máx.
4368	
4478	1.13 min

En la tabla 3.13 se muestra que el valor de Cochran calculado es menor que el valor crítico de Cochran al 1% de confianza que es de 0.834 como lo indican para $n = 5$ y $p = 3$ por lo que se acepta que no hay ningún valor rezagado en las conservas

c) Prueba numérica de observación de valores erráticos o atípicos. Prueba de Grubbs
 Los resultados y los valores críticos se presentan en la tabla 15 y tabla 16 respectivamente.

En la tabla 3.14 se muestra que los estadísticos de Grubbs máximo (máx.) calculado son menores o igual al valor crítico superior de Grubbs al 5% de confianza que es 1.16 para $p = 3$ y para el valor crítico superior de Grubbs al 1% de confianza que es 1.16 para $p = 3$ por lo que se acepta que no hay valores atípicos

Tabla 3.15 Resultados de Grubbs para los datos de determinación de Histamina en conserva de pescado

Promedio Analista.	Estadístico Grubbs calculado.
11	0.793 máx.
10	
11	1.123 min
29	1.048 máx.
28	
31	0.944 min

En la tabla 3.15 se muestra que los estadísticos de Grubbs máximo (máx.) calculados son menores o igual al valor crítico al superior de Grubbs al 5% de confianza que es 1.16 para $p = 3$ y para el valor crítico superior de Grubbs al 1% de confianza que es 1.16 para $p = 3$ por lo que se acepta que no hay valores atípicos. La aplicación de la prueba de Grubbs muestra que no hay ningún valor atípico o errático para todos los niveles de concentración.

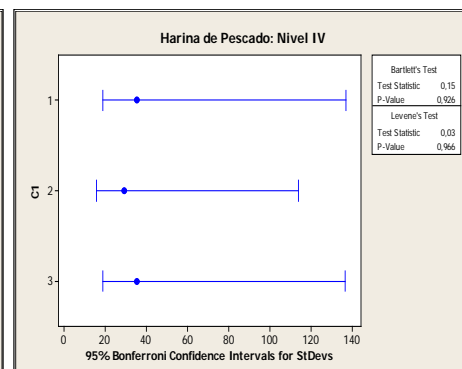
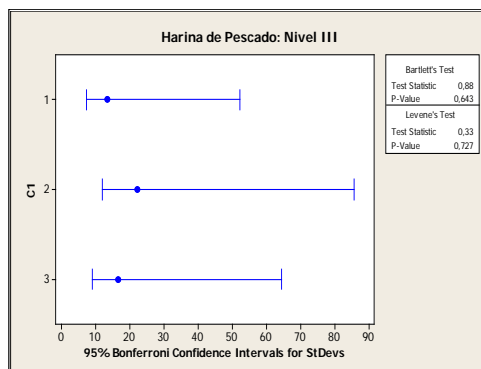
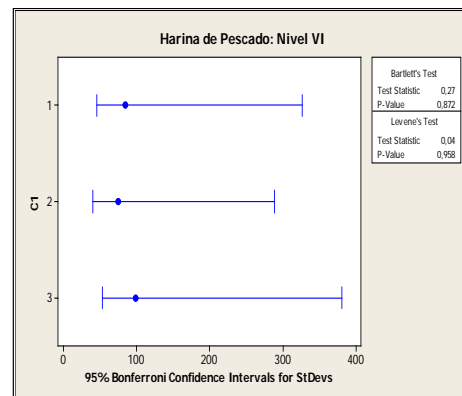
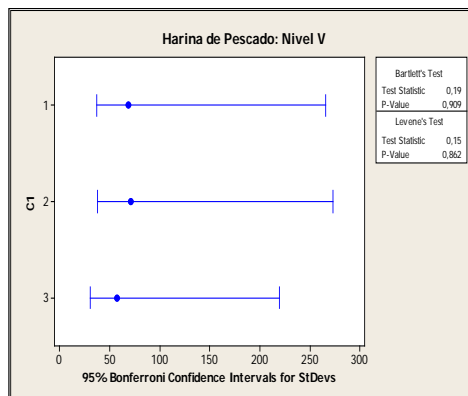
3.4 Homogeneidad.

En la tabla 3.16 se muestra los valores de X_0^2 y X_c^2 donde X_0^2 es menor que X_c^2 en todos los niveles de concentraciones de histaminas en harina y en conserva de pescado. Lo que permite aprobar la hipótesis nula y rechazar la hipótesis alterna existe homogeneidad de varianza al 95 % de confianza.

Tabla 3.16 Resultados de la prueba de Bartlett en harina y conserva respectivamente.

Concentración de histamina (ppm)	Sp ²	q	C	X ₀ ²	X _c ²
59	5.37	0.33	1.22	0.62	5.99
182	46.65	0.08	1.22	0.16	5.99
512	320.77	0.21	1.22	0.40	5.99
1018	1134.17	0.04	1.22	0.07	5.99
2207	4362.95	0.05	1.22	0.09	5.99
3332	7546.33	0.07	1.22	0.12	5.99
4434	10927.75	0.37	1.22	0.70	5.99
11	0.93	0.44	1.22	0.82	5.99
29	2.58	0.03	1.22	0.06	5.99

De los gráficos se obtienen los resultados de la Prueba de Bartlett. Los valores de p-valor en cada nivel evaluado es mayores a 0.05 en cada uno de ellos por lo que las muestras cumplen la homogeneidad de varianzas para todos los niveles.



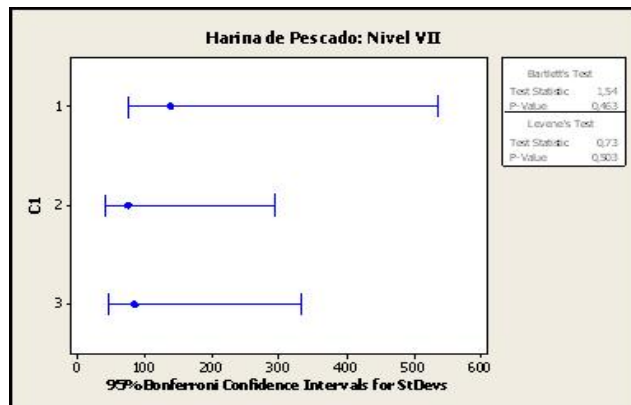


Figura 9

Prueba de Homogeneidad de Bartlett en harina de pescado para el nivel I hasta el nivel VII.

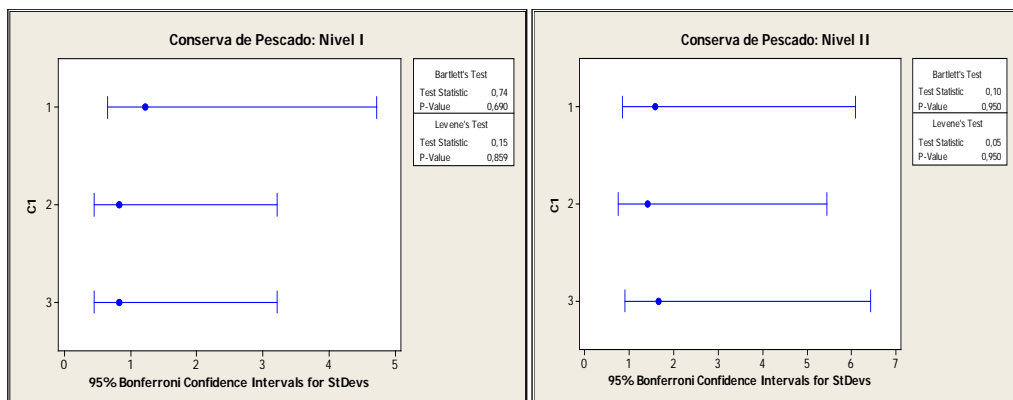


Figura 10

Prueba de Homogeneidad de Bartlett en conserva de pescado para el nivel I y nivel II.

En cada figura se muestra tres líneas paralelas las cuales tienen un punto si los puntos están cercanos a una línea vertical que los corta se puede ver que existe la homogeneidad de los datos evaluados. El p-valor de la prueba de Bartlett es mayor a 0.05 lo que lo confirma para cada nivel.

3.5 Precisión

La evaluación de la desviación estándar de repetibilidad y desviación estándar de reproducibilidad se muestra en la tabla siguiente permite evaluar la tendencia de los resultados de precisión obtenidos en ambas condiciones

En la tabla 3.17 los resultados obtenidos deben cumplir que la desviaciones estándar de repetibilidad sea menor que la desviación estándar de reproducibilidad.

Tabla 3.17 Resultados de la desviación estándar de repetibilidad (s_r) y Reproducibilidad (s_R) en harina y conserva respectivamente.

Promedio del analista			Promedio (ppm)	s_r	s_R
A	B	C			
61	59	58	59	2.32	2.48
186	182	177	182	6.83	7.49
521	515	499	512	17.91	19.60
1040	1016	1000	1018	33.68	36.28
2247	2191	2183	2207	66.05	68.56
3386	3273	3339	3332	86.87	96.27
4456	4368	4478	4434	104.54	110.02
11	10	11	11	0.97	0.99
29	28	31	29	1.61	1.98

Comparar los resultados de precisión de los tres analistas mediante el s_r y s_R se puede ver que la precisión es alta o se puede decir que la dispersión es baja en ambas matrices.

Tabla 3.18. Resultados de la desviación estándar relativa de repetibilidad (RSD_r) y de reproducibilidad (RSD_R) en harina y conserva respectivamente

Promedio del analista			Promedio (ppm)	RSD_r	RSD_R
A	B	C			
61	59	58	59	3.91	4.18
186	182	177	182	3.76	4.12
521	515	499	512	3.50	3.83
1040	1016	1000	1018	3.31	3.56
2247	2191	2183	2207	2.99	3.11
3386	3273	3339	3332	2.61	2.89
4456	4368	4478	4434	2.36	2.48
11	10	11	11	8.89	9.12
29	28	31	29	5.50	6.77

Expresando la precisión como la desviación estándar relativa se obtiene lo que se muestra en la tabla 3.18. los resultados de RSD_r y RSD_R para los siete niveles de concentración de histamina para harina de pescado y para los dos niveles de conserva de pescado. La tendencia de los resultados de los RSD_r y RSD_R es de disminuir con respecto al aumento de las concentraciones de los niveles de histamina. Igualmente sucede con la conserva de pescado. Lo que confirma lo que se esperaba que al ser más pequeña la concentración del nivel la dispersión aumenta ya sea en condiciones de repetibilidad o reproducibilidad.

Evaluación de los límites se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 3.19. Resultados de los límites de repetibilidad (r) y los límites de reproducibilidad (R) en harina y conserva respectivamente

Promedio (ppm)	r	R
59	6.49	6.94
182	19.12	20.97
512	50.15	54.87
1018	94.3	101.58
2207	184.95	191.96
3332	243.23	269.57
4434	292.7	308.06
11	2.71	2.78
29	15.41	18.96

Los límites de repetibilidad y los límites de reproducibilidad mostrados en la tabla 3.19 permiten restringir el valor de dispersión expresado como desviación estándar para cada nivel de concentración para ambas matrices. La desviación estándar de repetibilidad como la de reproducibilidad no debe superar este valor.

Límite de desviación estándar relativa se muestran en la tabla siguiente.

Tabla 3.20. Límites de desviación estándar relativa de repetibilidad y reproducibilidad en harina y conserva respectivamente

Promedio (ppm)	Límite DRS_r	Límite DRS_R
59	10.94	11.71
182	10.53	11.55
512	9.80	10.72
1018	9.26	9.97
2207	8.38	8.70
3332	7.30	8.09
4434	6.60	6.95
11	24.88	25.55
29	15.41	18.96

Los valores de desviación estándar relativa de repetibilidad mostradas en la Tabla 3.18 deben de ser menores a los valores de los límites de desviación estándar relativa

de repetibilidad para cada nivel de concentración mostradas en la tabla 3.20 estos resultados indican que se cumple la relación esperada. Lo mismo sucede para desviación estándar relativa de reproducibilidad se cumple la relación esperada.

3.6 Linealidad.

a. Para comprobar la linealidad y regresión de las curvas de calibración de la histamina, se lee en el equipo seis réplicas de la curvas de calibración se muestra en la tabla 3.21 los resultados.

Tabla 3.21. Curvas de calibración para evaluación la linealidad del método

	Concentración (mg/L)	Área del cromatograma		Concentración (mg/L)	Área del cromatograma
Blanco	0	0	std4	10.151	409702
	0	0		10.151	409372
	0	0		10.151	341074
	0	0		10.151	380281
	0	0		10.151	411139
	0	0		10.151	356001
std1	1.015	36085	std5	30.452	1162043
	1.015	33746		30.452	1200390
	1.015	34184		30.452	1119238
	1.015	37220		30.452	1130777
	1.015	31353		30.452	1097090
	1.015	32698		30.452	1138239
std2	2.03	71506	std6	50.753	2079125
	2.03	75632		50.753	1979649
	2.03	72907		50.753	1808851
	2.03	76105		50.753	1792794
	2.03	74164		50.753	1877296
	2.03	65056		50.753	1904502
std3	4.06	142509	std7	101.507	4085413
	4.06	147341		101.507	4116861
	4.06	133392		101.507	3653964
	4.06	132784		101.507	3739373
	4.06	135450		101.507	3823657
	4.06	149445		101.507	3822688

La ecuación de regresión lineal obtenida de las seis replicas es la siguiente: $y = -8832.0 + 38127x$

b. Cálculo de las Pruebas estadísticas y los criterios de aceptación para evaluar la regresión lineal.

Tabla 3.22 Resultados de la prueba de hipótesis de la pendiente y del intervalo de confianza.

t	t_b	IC $_{\beta}$ superior	IC $_{\beta}$ inferior
2.01	119.6	38768.5	37485.5

Se rechaza la hipótesis nula por que se cumple que t es menor que el t_b calculado entonces la pendiente es diferente de cero. Se obtiene los intervalos donde se debe de encontrar la pendiente.

Tabla 3.23 Resultados de la prueba para demostrar la convergencia al origen

t	t_a	IC $_{\alpha}$ superior	IC $_{\alpha}$ inferior
2.01	0.66	17934.7	-35598.7

Se acepta la hipótesis nula por que se cumple que t es mayor que el t_a calculado entonces el origen pasa por el cero de la curva de calibración o cercano. Se obtiene los intervalos donde se debe de encontrar el origen.

Tabla 3.24 Resultados de la prueba de hipótesis para el coeficiente de correlación

t	t_r
2.01	119.7

Se rechaza la hipótesis nula por que se cumple que t es menor que el t_r calculado entonces existe correlación entre las dos variables x e y.

c. Resultados de la prueba de la hipótesis para demostrar regresión y desvío de la linealidad.

Se utilizó la prueba de regresión en el programa minita para obtener la demostración de la regresión y la linealidad. También se puede demostrar las pruebas anteriormente mencionadas por que la regresión te da los valores de t para la pendiente y el t del intercepto de la curva de calibración lo que falta es el t de correlación pero sí te da el valor de r y r cuadrado para poder calcularlo. Lo que también da son los valores de p-valor para las cuatro pruebas lo cual se puede comparar con el valor de alfa al 5% o 0.05 lo que permite llegar a las mismas conclusiones

Tabla 3.25 Análisis de la regresión y la lineal

Predictor	Coef	SE Coef	T	p	
Intercepto	-8832	13298	-0.66	0.510	
Pendiente	38127.0	318.7	119.65	0.000	
S	73772.6				
R-Sq	99.7 %				
R-Sq(adj)	99.7%				
Ecuación de regresión	C3 = Y=	-8832	+ 38127 (C2= X)		
Source	DF	SS	MS	F	p
Regresión	1	7.79148E+13	7.79148E+13	14316.28	0.000
Residual Error	46	2.50350E+11	5442390739		
Linealidad	6	4962991168	827165195	0.13	0.991
Pure Error	40	2.45387E+11	6134674571		
Total	47	7.81651E+13			

El valor del F_{α} (1,46,0.05) para la regresión de grado de libertad 1 y 46 es de 4.08 al 95% y el F_c es de 14316.28 se cumple que el F_c de la regresión es mayor que el F_{α} (1,46,0.05). Se concluye que hay regresión es estadísticamente significativa. El F_{α} (6,40,0.05) de la linealidad de grado de libertad de 6 y 40 es de 2.34 al 95% y el F_c es 0.13 se cumple que el F_c de la linealidad es menor que el F_{α} (6,40,0.05). Se concluye que se da linealidad. Para la prueba de hipótesis de la pendiente t_b es 119.7 mayor a la t , que es 2.01 para n-2 grados de libertad, con un nivel de significancia de 95% con dos colas. Se rechaza la hipótesis nula lo mismo se puede hacer para la convergencia al origen

3.7 Límite de detección y límite de cuantificación.

Ecuación de la curva de calibración.

$$Y = -8832 + 38127X \quad (3.1)$$

Considerando los puntos de concentración de histamina más pequeñas. Es equivalente a 1.015 ppm de histamina. en las seis curvas de calibración.

Tabla 3.26 Muestra el resultado de la desviación estándar de las seis áreas de las concentraciones más baja de las curvas de calibración

Áreas	S_b
36085	2155.93
33746	
34184	
37220	
31353	
32698	

a) Se determinó el LD de la siguiente manera:

Se calcula el límite de detección de histamina en ppm

En la Ecuación 3.1 se evaluó $X = 0$ y se obtiene $Y_0 = -8832$ reemplazando en la Ecuación 1.40

$LD = (-8832) + (3 \times 2155.93) = -2364.26$ es el nuevo valor de Y

Reemplazando en la Ecuación 3.1 y despejando X

$$X = (Y + 8832) / 38127 = (-2364.26 + 8832) / 38127$$

$$X = 0.170 \text{ ppm}$$

Para harina de pescado:

Peso de muestra = 0.20 g, volumen final= 10 mL, FD = 50

Para Harina de Pescado: $LD = 0.170 \text{ ppm} \times FD = 8.48 \text{ ppm}$

Para conserva de pescado:

Peso de muestra =10 g, volumen final=100 mL, FD = 10

Para Conserva de Pescado: $LD = 0.170 \text{ ppm} \times FD = 1.70 \text{ ppm}$,

Dónde:

FD: Factor de dilución.

b) Se determinó el LC de la siguiente manera:

En la Ecuación 3.1 para $X = 0$, $Y = -8832$ y $S_b = 2155.93$

Calculando el límite de cuantificación de histamina mediante la Ecuación 1.41

$LC = -8832 + (10 \times 2155.93) = 12727.25$ es el nuevo valor de Y reemplazando en la Ecuación 3.1 y despejando X:

$$X = (Y + 8832) / 38127 = (12727.25 + 8832) / 38127$$

$$X = 0.565 \text{ ppm}$$

Para harina de pescado: $LC = 0.565 \text{ ppm} \times FD = 28.27 \text{ ppm}$,

Para conserva de pescado: $LC = 0.565 \text{ ppm} \times FD = 5.65 \text{ ppm}$,

Se obtiene los siguientes resultados:

Tabla 3.27 LD y LC calculados como muestra.

Matriz	LD (ppm)	LC (ppm)
Harina de Pescado	8.42	28.27
Conserva de Pescado	1.70	5.65

Tabla 3.28 LD y LC establecidos para el método.

Matriz	LD (ppm)	LC (ppm)
Harina de Pescado	20	50
Conserva de Pescado	5	10

Los valores que se muestran en tabla 3.27 se establecen como LD y LC del método porque al ensayar todo el método completo estos resultados de la tabla 3.26 se obtienen valores por encima de los resultados por lo que se realiza la fortificación de muestras de harina de pescado en los valores de 20 ppm dando resultados óptimos para determinar el LD. Lo mismo se realiza para el valor de 50 ppm para el LC cumpliéndose que el LD del método debe estar por debajo del menor punto de la curva de calibración expresado como muestra.

3.8 Sensibilidad.

Se obtiene los siguientes resultados:

Tabla 3.29 Datos de la regresión lineal

Analito.	Ecuación de la curva	Sensibilidad del método
Histamina	$Y = 38127X - 8832$	38127

La sensibilidad determinada para el método es de 38127, el método tiene sensibilidad alta debido a que el cociente es bastante alto. Por lo que se puede decir que el método puede determinar concentraciones bastante bajas de histamina.

3.9 Selectividad del método.

Tabla 3.30 Resultados de la evaluación de la selectividad para harina de pescado.

N° de muestra	Muestra positiva (ppm)	Blanco de método (ppm)	Estándar de calibración correspondiente a la muestra positiva (ppm)
1	95	0	104
2	96	0	101
3	96	0	104

a) Evaluación de los resultados de la tabla 3.30:

Como se observada hay ausencia de una señal alta (histamina) en el blanco del método, por esto se entiende que no hay interferencia de las siguientes fuentes: solventes, reactivos, impurezas, contaminación provocada por los aparatos de preparación de muestra, el equipo donde se realiza la lectura. Se obtuvo la concentración de 95 ppm de histamina de la muestra positiva y la concentración estándar de calibración de 104 ppm de histamina, comparando ambas concentraciones confirmamos que solo el analito de interés está siendo medido en la muestra positiva (evaluando el cromatograma de muestra positiva y del estándar de calibración). También se comparó las medias del estándar evaluado versus un valor cercano a la que tiene la muestra positiva. Para lo que se realiza la evaluación de la prueba contraste de t que se muestra en la siguiente tabla.

Donde el t calculado es 6.6 y el t crítico con grado de libertad 2 al 99% es de 9.9 lo que muestra que no hay diferencia significativa para rechazar la hipótesis nula.

$$H_0: \mu_1 = \mu_2$$

$$H_1: \mu_1 \neq \mu_2$$

La diferencia entre las concentraciones de las medias de las dos propuestas está dentro de lo aceptable.

b) Evaluación de los resultados de la tabla 3.32: En la columna del blanco del método se observa que hay ausencia de una señal y también hay ausencia de una señal en el blanco de matriz por lo que se puede afirmar que no hay interferente. Por lo que se acepta que la señal existe en la muestra positiva se debe solo a la histamina al igual que en el estándar de calibración que solo se debe a la histamina.

Tabla 3.31 Evaluación del contraste de la t

N° de muestra	Muestra positiva (ppm)	Blanco de método (ppm)	Estándar de calibración correspondiente a la muestra positiva (ppm)
1	95	0	104
2	96	0	101
3	96	0	104
Media	95.7		103
Desviación estándar	0.6		1.73
n	3		3
t calculado	6.6		
gl	2		
t crítico 99%	9.92		

Tabla 3.32 Resultados de la evaluación de la Selectividad para conserva de pescado.

N° de muestra	Blanco de Matriz (ppm)	Blanco de método (ppm)	Estándares de calibración de concentración baja (ppm)
1	0	0	104
2	0	0	101
3	0	0	104

c) La matriz harina de pescado y conserva de pescado presentan ausencia de otro analito interferente en el mismo tiempo de retención de la señal de la histamina. Al evaluar los resultados, se observa que no existe interferencia alguna. La histamina es el único responsable de la señal. El método es selectivo, ya que la señal es solo de la histamina.

3.10 Rango

Según el análisis de la regresión y la linealidad para la curva de calibración de la histamina se obtiene una tabla donde se muestra los resultados obtenidos con el cual se establece el límite inferior y el límite superior. del rango de trabajo del método.

Tabla 3.33 Valor del F y p-valor obtenido del análisis de regresión y la linealidad

Fexp	F (46,40) 95%	p-valor
0.13	1.660	0.991

Como el Fexp es menor que el F(46,40) se acepta que los datos se comportan linealmente lo que también se confirma con el p-valor de 0.991 que es mayor que 0.05 por lo que el rango se puede establecer desde el primer punto de la curva de calibración hasta el valor más alto de la curva de calibración el cual se evalúa como muestra como se indica en la tabla siguiente.

Tabla 3.34 Primer y último punto de la curva de calibración para obtener el rango del método.

Matriz	En términos de concentración del estándar (mg/L)		En términos de muestra (mg/Kg)	
	primer punto	último punto	primer punto	último punto
Harina de pescado	1.015	101.51	50.75	5075.35
Conserva de pescado	1.015	101.51	10.15	1015.07

LC que se estable es de 50 ppm en harina de pescado y el primer punto de la curva es de 50.75 ppm expresado como muestra por lo que el rango que se estable para el método es desde 50 ppm hasta 5000 ppm y en conserva de pescado LC que se estable es de 10 ppm y el primer punto de la curva es de 10.15 ppm por lo que el rango del método se establece desde 10 ppm hasta 1020 ppm.

3.11 Robustez.

Los factores elegidos son los cambios que podrían afectar al método pero estos cambios deben de hacerse en cantidades pequeñas y deben de ser por encima del valor y por debajo del valor que indica el método. Los mismos factores se evaluarán para todos los niveles de concentración en las dos matrices.

Los factores evaluaciones y los resultados obtenidos en la robustez para harina de pescado se muestran a continuación

Tabla 3.35 Resultados de la t calculado para el primer nivel de concentración de histamina en harina de pescado.

Factores	Promedio	D	t calculado
Peso de muestra: 0,21 g	74	10,72	1,84
Peso de muestra: 0,19 g	85		
Tiempo de agitación: 0,5 h	80	0,16	0,03
Tiempo de agitación: 0,3 h	80		
Temperatura de reacción: 60 °C	76	7,84	1,35
Temperatura de reacción: 50 °C	84		
Tiempo de reacción: 65 min	84	7,96	1,37
Tiempo de reacción: 55 min	76		
Flujo : 1,4 mL/min	80	0,65	0,11
Flujo : 1,2 mL/min	79		
Longitud de onda : 256 nm	76	7,29	1,25
Longitud de onda : 252 nm	83		
Volumen de inyección: 16 μ L	82	4,98	0,85
Volumen de inyección: 14 μ L	77		

En la tabla 3.35 los t calculados para cada uno de los factores son menores al valor del t crítico que es 2,15. Esto permite concluir que los factores evaluados no afectan el resultado para el primer nivel de concentración.

Tabla 3.36. Resultados del t calculado para el segundo nivel de concentración de histamina en harina de pescado

Promedio	D	t calculado
167	5,25	0,71
172		
170	1,21	0,16
169		
172	3,54	0,48
168		
175	10,24	1,38
165		
171	1,77	0,24
169		
166	8,48	0,14
174		
173	5,77	0,78
167		

En la tabla 3.36 los t calculados para cada uno de los factores evaluados son menores al valor del t crítico que es 2,15. Esto permite concluir que los factores evaluados no afectan al resultado para el segundo nivel de concentración.

Tabla 3.37 Resultados del t calculado para el tercer nivel de concentración de histamina en harina de pescado

Promedio	D	t calculado
464	2,19	0,17
466		
466	2,63	0,21
464		
460	9,30	0,73
470		
476	22,76	1,79
454		
467	4,13	0,32
463		
469	9,16	0,72
460		
466	1,39	0,11
464		

En la tabla 3.37 los t calculados para cada uno de los factores evaluados son menores al valor del t crítico que es 2,15. Esto permite concluir que los factores evaluados no afectan al resultado para el tercer nivel de concentración.

Tabla 3.38. Resultados del t calculado para el cuarto nivel de concentración de histamina en harina de pescado.

Promedio	D	t calculado
862	7,72	0,39
870		
865	2,43	0,12
867		
872	11,40	0,57
860		
875	19,25	0,97
856		
875	18,28	0,92
857		
879	26,41	1,33
853		
865	2,61	0,13
867		

En la tabla 3.38 los t calculados para cada uno de los factores evaluados son menores al valor del t crítico que es 2,15. Esto permite concluir que los factores evaluados no afectan al resultado para el cuarto nivel de concentración.

Tabla 3.39. Resultados del t calculado para el quinto nivel de concentración de histamina en harina de pescado

Promedio	D	t calculado
1793	11,20	0,31
1782		
1767	40,05	1,10
1808		
1807	38,91	1,07
1786		
1796	17,78	0,49
1779		
1807	38,68	1,06
1768		
1755	64,61	1,78
1820		
1775	25,03	0,69
1800		

En la tabla 3.39 los t calculados para cada uno de los factores evaluados son menores al valor del t crítico que es 2,15. Esto permite concluir que los factores evaluados no afectan al resultado para el quinto nivel de concentración.

Tabla 3.40. Resultados del t calculado para el sexto nivel de concentración de histamina en harina de pescado.

Promedio	D	t calculado
2655	101,22	2,03
2762		
2729	41,02	0,78
2688		
2690	37,17	0,70
2727		
2728	39,28	0,74
2689		
2715	13,14	0,25
2702		
2694	29,20	0,55
2723		
2712	7,58	0,14
2705		

En la tabla 3.40 los t calculados para cada uno de los factores evaluados son menores al valor del t crítico que es 2,15. Esto permite concluir que los factores evaluados no afectan al resultado para el sexto nivel de concentración.

Tabla 3.41. Resultados del t calculado para el sexto nivel de concentración de histamina en harina de pescado.

Promedio	D	t calculado
3513	116,42	1,70
3629		
3533	76,23	1,12
3609		
3611	79,67	1,17
3531		
3575	8,16	0,12
3567		
3575	7,89	0,12
3567		
3552	38,23	0,56
3590		
3612	82,34	1,21
3530		

En la tabla 3.41 los t calculados para cada uno de los factores evaluados son menores al valor del t crítico que es 2,15. Esto permite concluir que los factores evaluados no afectan al resultado para el séptimo nivel de concentración.

Resultados de la evaluación para las dos concentraciones de conserva de pescado:

Tabla 3.42. Resultados del t calculado para el primer nivel de concentración de histamina en conserva de pescado.

Promedio	D	t calculado
16	1,54	1,79
17		
17	0,35	0,41
17		
16	0,85	1,00
17		
17	0,46	0,54
16		
17	1,44	1,68
16		
16	1,82	2,12
18		
17	0,73	0,85
16		

En la tabla 3.42 y en la tabla 3.43 los t calculados para cada uno de los factores evaluados son menores al valor del t crítico que es 2,15. Esto permite concluir que los factores evaluados no afectan al resultado para el primer nivel de concentración.

Y también para el segundo nivel de concentración en las muestras de conservas.

Tabla 3.43. Resultados del t calculado para el segundo nivel de concentración de histamina en conserva de pescado.

Promedio	D	t calculado
32	2,56	1,81
34		
33	0,49	0,34
33		
33	0,95	0,67
34		
34	1,63	1,15
32		
34	1,06	0,75
33		
32	1,70	1,20
34		
33	0,21	0,15
33		

3.12 Estimación de la incertidumbre.

La estimación de la incertidumbre se determina para cada nivel de concentración de histamina y se realiza una curva de calibración del promedio versus estimación de la incertidumbre por cada nivel. Se obtiene la ecuación de la estimación de la incertidumbre para ambas matrices que se muestran en la tabla siguiente.

Tabla 3.44 Ecuaciones de la estimación de la incertidumbre en harina de pescado y conserva de pescado.

Producto	Niveles	Promedio (ppm)	U	Ecuación de la incertidumbre.
Harina de Pescado	1	59	6.8	$y = 0.093x + 7.687$
	2	182	20.7	
	3	512	56.1	
	4	1018	107.8	
	5	2207	220.6	
	6	3332	324.2	
	7	4434	411	
Conserva de pescado	1	11	2.2	$y = 0.113x + 0.733$
	2	29	4.6	

CAPÍTULO 4 : CONCLUSIONES.

- i. Se evaluó la veracidad del método y se obtuvo que el F calculado es 1.66 que es menor que el F crítico de 2.53 en harina de pescado y en conserva de pescado el F calculado es 0.90 que es menor al F crítico que es de 3.68 en los siete niveles de concentración de histamina. con lo que se confirma la veracidad del método.
- ii. Se evaluó la precisión del método y se obtiene los límites de SRD_F y el SRD_R y se cumple que SRD_F y SRD_R son menor que el límite para cada nivel de histamina en harina de pescado y conserva de pescado por lo que la precisión es alta.
- iii. Se obtiene la linealidad del método y se cumple la regresión el F calculado que es de 14316.28 es mayor que el F crítico(1,46) que es de 4.08 y también se cumple la linealidad por que F calculado es 0.13 y es menor que es F crítico(6,40) 2.34
- iv. Se obtiene el LD del método para la matriz harina de pescado el cual es de 8.42 ppm y en la conserva de pescado el cual es 1.70 ppm y se determinó el límite de cuantificación del método para la matriz harina de pescado el cual es 28.27 ppm y en la matriz conserva de pescado el cual es 5.65.ppm
- v. Se confirmó la sensibilidad del método para la matriz harina de pescado y para matriz conserva de pescado el cual es 38127.
- vi. Se evaluó la selectividad en harina de pescado donde t calculado es 6.6 es menor que el t crítico (2,99%) que es de 9.9 por lo que se acepta la hipótesis nula y en la conserva de pescado se obtuvo que la señal encontrada en la muestra blanco sólo proviene del estándar por lo que se confirmó que el método es selectivo en ambas matrices.
- vii. Se obtiene el rango de trabajo. para la matriz harina de pescado el cual es de 50 ppm hasta 5000 ppm y para la matriz conserva de pescado es de 10 ppm hasta 1020 ppm.
- viii. Se evaluó la robustez en los siete niveles de concentración de histamina. en harina de pescado y en conserva de pescado se obtuvo que el t calculado es

siempre menor que el t crítico que es de 2.15 el método es robusto a estas pequeñas variaciones.

- ix. Se obtuvo la ecuación de la incertidumbre en los siete niveles de concentración de histamina en harina de pescado el cual es $y=0.093+7.68x$ y en los dos niveles de concentración para la conserva de pescado el cual es $y=0.133+0.733x$
- x. Se cumplió con obtener y confirmar todos los parámetros para la validación del método de histamina por la técnica de cromatografía líquida de alta resolución en harina de pescado y conserva de pescado por lo que concluimos que el método está validado.

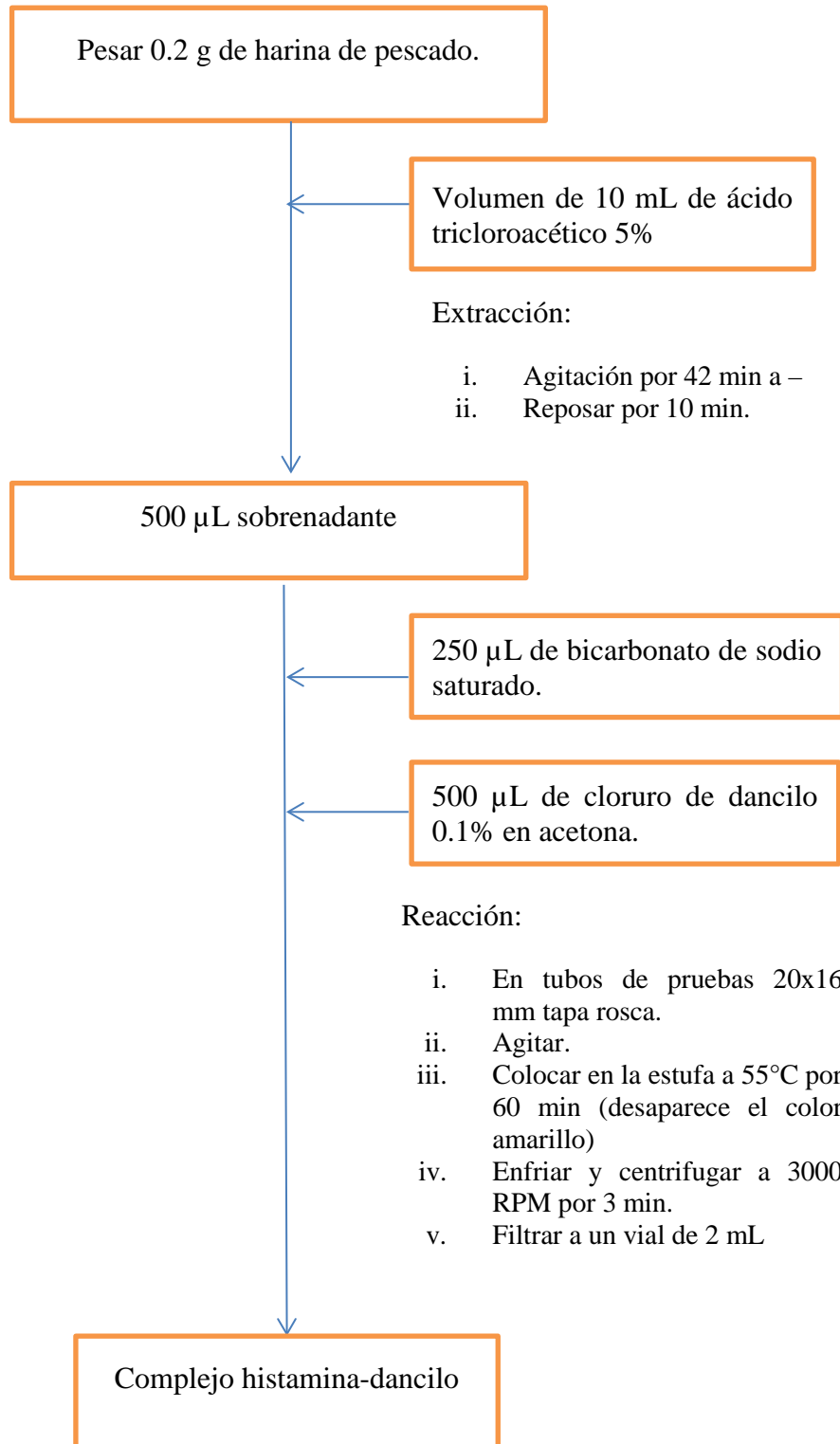
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. Albrecht, M. y Salas A. (2001). Histamina Revisión (escombrotóxina). Infopesca Internacional. N°8 10-1. Recuperado de: <http://www.oannes.org.pe/seminario/03paSalasHistamina.html>
2. Bertin, M., Naykki, T., Hovind, H. y Krysell, M. (2012) Handbook for calculation of Measurement Uncertainty in Environmental Laboratories. (Ed. 3.1). Oslo. Nordic Innovation Stenbergsgata.
3. Cardenas P. (2014) Validación de Métodos de Ensayo. Instituto para la Calidad. PUCP.
4. Comité Técnico ISO/TC 69, 1994. Exactitud (veracidad y precisión) de los métodos de medición y resultados. Parte 1 Principios Generales y Definiciones 5725-1. Ginebra
5. Comité Técnico ISO/TC 69, 1994. Exactitud (veracidad y precisión) de los métodos de medición y resultados. Parte 2. Método básico para la determinación de la repetibilidad y la reproducibilidad de un método de medición normalizado. ISO 5725-2. Ginebra
6. Comité Técnico ISO/TC69, 1994. Exactitud (veracidad y precisión) de los métodos de medición y resultados. Parte 4. Los métodos básicos para la determinación de la veracidad de un método de medición normalizado ISO 5725-4. Ginebra
7. Compañó, R. y Ríos, A. (1999) Garantía de la calidad en los laboratorios analíticos. Madrid. Síntesis S.A. pág. 216-221
8. Covenin ISO 3534-1, 1995. Estadísticas. Vocabulario y símbolo. Parte 1: Términos relativos a probabilidades y estadística general.
9. Determinación de aminos biogénicos en embutidos secos por Cromatografía Líquida, 1993. El Diario de la AOAC Internacional, 76 (3), 575.
10. Duffau et al., (2010). *Validación de Métodos y determinación de la incertidumbre de la medición*. (Guía Técnica N° 1 PP. 4, 5, 7,27) Instituto de Salud Pública. Chile. Recuperado de: http://www.ispch.cl/sites/default/files/documento_tecnico/2010/12/Guia%20T%20B3n_1.pdf
11. Histamina en Mariscos, 2005, (18.Ed). AOAC Método Oficial 977.13
12. Jiménez, J. R., Torres, G. B. y Arias, J. A. (2009). Histamina y Comunicación Intercelular: 99 años de historia. Rev. Biomed, Vol.20 (N° 2), 101-102.

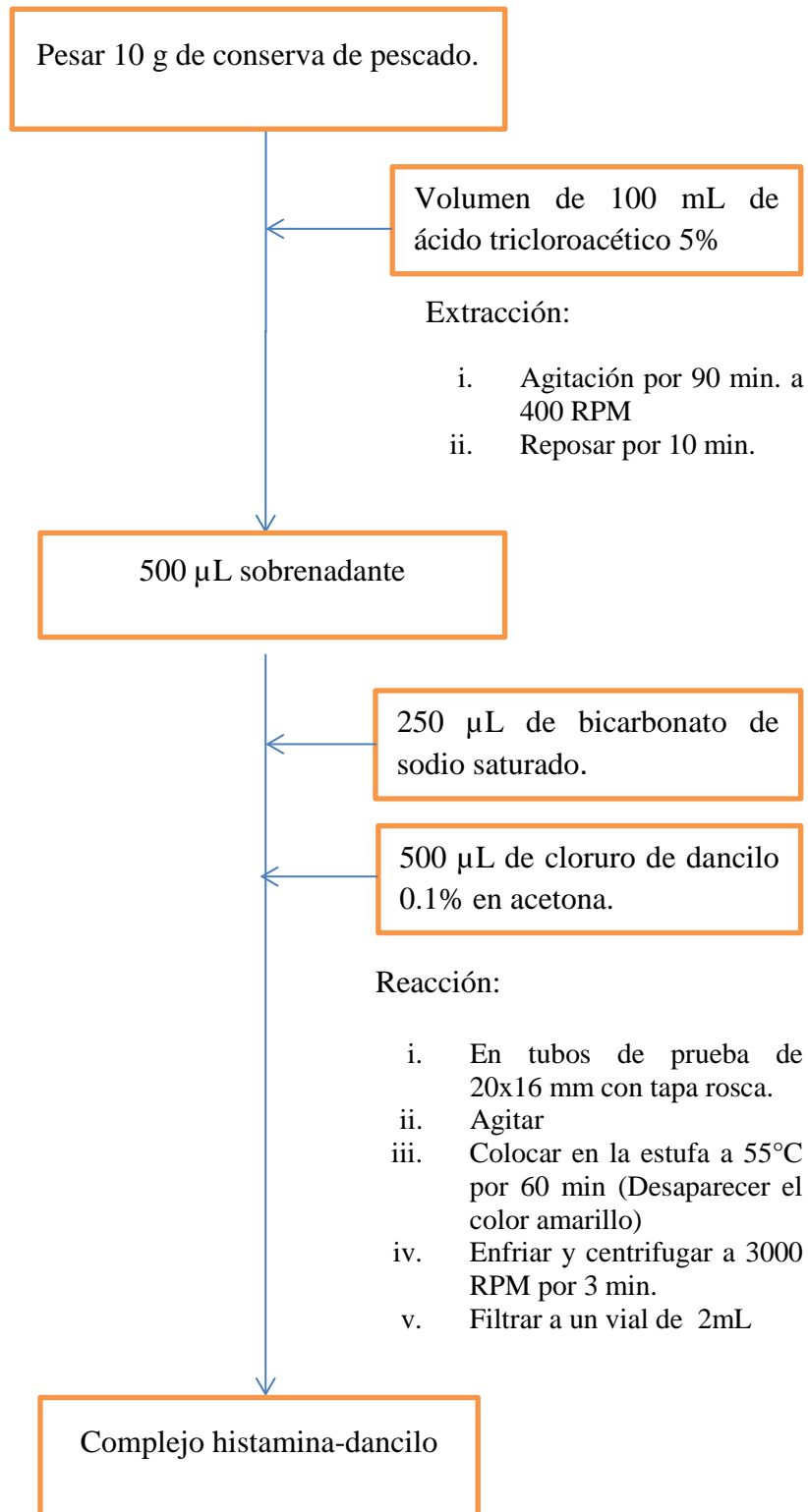
13. Métodos Analíticos Adecuados a su Propósito Guía de Laboratorio para la Validación de Métodos y Temas Relacionados, 2005, (2da Ed).p.55-57 Grupo de trabajo de la Eurachen .México. Recuperado de:http://www.fbioyf.unr.edu.ar/evirtual/pluginfile.php/131037/mod_resource/content/1/Eurachem-Guia-Validacion-CNM-MRD-030-2da-Ed.pdf
14. Método entre laboratorios analíticos de validación internacionales, 1996 AOAC
15. Miller, J. N. y Miller, J. C. (2002). *Estadística y Quimiometría para Químicos Analítica*. pp 48. Madrid. Prince Hall Pearson Educación S. A.
16. Olivieri A., (s. f.). Curso de Regresión Lineal en Química Analítica. Recuperado de:<http:// analisisindustrial.wikispaces.com/file/view/Apunte+regresion+lineal.pdf>
- 17 Ortiz, S. D. (2003). Elaboracion de Harina de Pescado. Tesis de licenciatura publicada. Universidad Catolica de Argentina, Buenos Aires, Argentina.
18. Pérez G., (s. f.) iod: www.coenzima.com/s-adenosil-metionina-sam
19. Productos hidrobiológicos Determinación de Histamina y otras aminas biogénicas Método HPLC con detector UV, 2001. Norma Chilena N Ch 2637.
20. Rodríguez C., Gomes H., Reátegui S. (2002) Estudio de la sensibilidad espectrofotométrica del cromo (III) y el cromo (IV). *Revista Peruana de Química e Ingeniería Química* (Vol. 5) pp.29-30
Recuperado de:<http://www.revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/quim/article/viewFile/4336/3459>
21. Ruiloba, A. R. (2003, 1 de febrero). Resolución Comisión de Reglamentos Técnicos y Comerciales N° 0006 Indecopy-CRT. *El Peruano*, iod:2388363-2388367.
22. Ruiz, E. (1987). *Histamina en Pescado*. Fonaiap Divulga Colección N° 24. Recuperado de:http://www.sian.inia.gob.ve/repositorio/revistas_tec/FonaiapDivulga/fd24/texto/histamina.htm
23. Wood, R. Nilsson A. y Wallin H. (1998). *Calidad en el Laboratorio de Análisis de Alimentos*. pp.79-81-93. Cambridge. Thomas Graham House, TheRoyalSocietyofChemistry. Recuperado de:https://books.google.com.pe/books?id=w6_iY0Cs9AC&pg=PA107&lpg=PA107&dq=AOAC+Internati onal.+Interlaboratory+Analytical+Method+Validation.+Short+Course.+1996&source=bl&ot

ANEXOS.

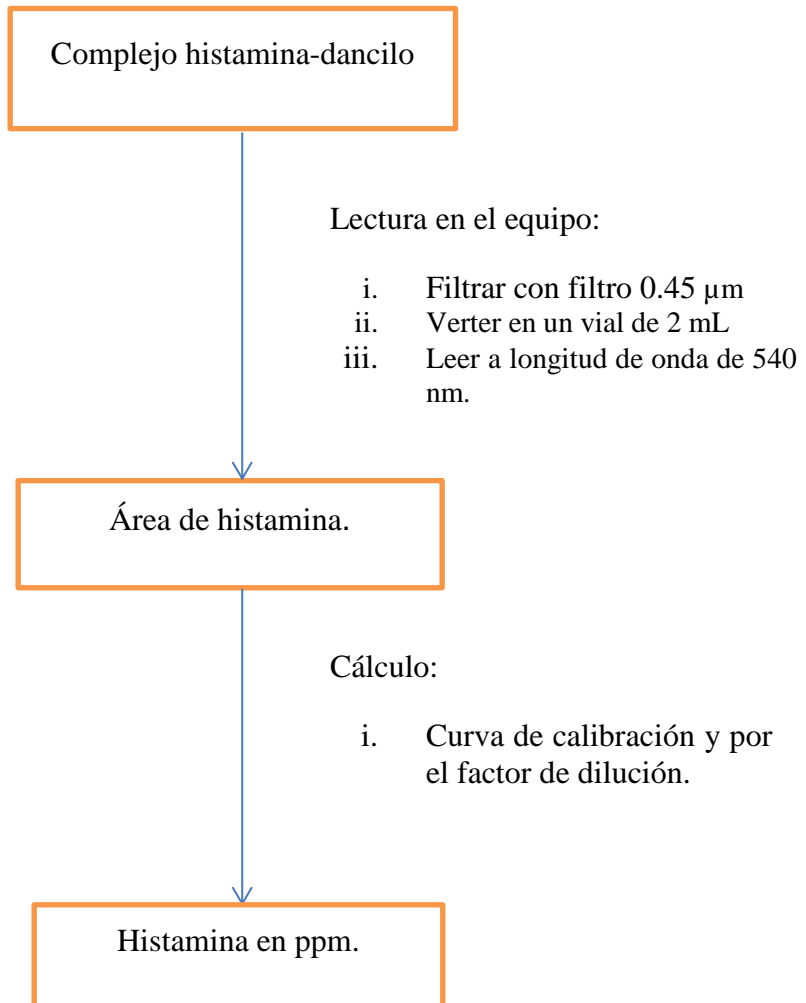
A. Diagrama de flujo para el ensayo de histamina en harina de pescado.



B. Diagrama de flujo para el ensayo de histamina en conserva de pescado.



C. Diagrama de flujo para leer en el HPLC



TABLAS ESTADÍSTICAS

.1 En la tabla 4, se proporciona los valores críticos para la prueba de Cochran (véase 3.3).

TABLA 4 - Valores críticos para la prueba de Cochran

P	N = 2		n = 3		n = 4		n = 5		n = 6	
	1%	5%	1%	5%	1%	5%	1%	5%	1%	5%
2	-	-	0,995	0,975	0,979	0,939	0,959	0,906	0,937	0,877
3	0,993	0,967	0,942	0,871	0,883	0,798	0,834	0,746	0,793	0,707
4	0,968	0,906	0,864	0,768	0,781	0,684	0,721	0,629	0,676	0,590
5	0,928	0,841	0,788	0,684	0,696	0,598	0,633	0,544	0,588	0,506
6	0,883	0,781	0,722	0,616	0,626	0,532	0,564	0,480	0,520	0,445
7	0,838	0,727	0,664	0,561	0,568	0,480	0,508	0,431	0,466	0,397
8	0,794	0,680	0,615	0,516	0,521	0,438	0,463	0,391	0,423	0,360
9	0,754	0,638	0,573	0,478	0,481	0,403	0,425	0,358	0,387	0,329
10	0,718	0,602	0,536	0,445	0,447	0,373	0,393	0,331	0,357	0,303
11	0,684	0,570	0,504	0,417	0,418	0,348	0,366	0,308	0,332	0,281
12	0,653	0,541	0,475	0,392	0,392	0,326	0,343	0,288	0,310	0,262
13	0,624	0,515	0,450	0,371	0,369	0,307	0,322	0,271	0,291	0,243
14	0,599	0,492	0,427	0,352	0,349	0,291	0,304	0,255	0,274	0,232
15	0,575	0,471	0,407	0,335	0,332	0,276	0,288	0,242	0,259	0,220
16	0,553	0,452	0,388	0,319	0,316	0,262	0,274	0,230	0,246	0,208
17	0,532	0,434	0,372	0,305	0,301	0,250	0,261	0,219	0,234	0,198
18	0,514	0,418	0,356	0,293	0,288	0,240	0,249	0,209	0,223	0,189
19	0,496	0,403	0,343	0,281	0,276	0,230	0,238	0,200	0,214	0,181
20	0,480	0,389	0,330	0,270	0,265	0,220	0,229	0,192	0,205	0,174
21	0,465	0,377	0,318	0,261	0,255	0,212	0,220	0,185	0,197	0,167
22	0,450	0,365	0,307	0,252	0,246	0,204	0,212	0,178	0,189	0,160
23	0,437	0,354	0,297	0,243	0,238	0,197	0,204	0,172	0,182	0,155
24	0,425	0,343	0,287	0,235	0,230	0,191	0,197	0,166	0,176	0,149
25	0,413	0,334	0,278	0,228	0,222	0,185	0,190	0,160	0,170	0,144
26	0,402	0,325	0,270	0,221	0,215	0,179	0,184	0,155	0,164	0,140
27	0,391	0,316	0,262	0,215	0,209	0,173	0,179	0,150	0,159	0,135
28	0,382	0,308	0,255	0,209	0,202	0,168	0,173	0,146	0,154	0,131
29	0,372	0,300	0,248	0,203	0,196	0,164	0,168	0,142	0,150	0,127
30	0,363	0,293	0,241	0,198	0,191	0,159	0,164	0,138	0,145	0,124
31	0,355	0,286	0,235	0,193	0,186	0,155	0,159	0,134	0,141	0,120
32	0,347	0,280	0,229	0,188	0,181	0,151	0,155	0,131	0,138	0,117
33	0,339	0,273	0,224	0,184	0,177	0,147	0,151	0,127	0,134	0,114
34	0,332	0,267	0,218	0,179	0,172	0,144	0,147	0,124	0,131	0,111
35	0,325	0,262	0,213	0,175	0,168	0,140	0,144	0,121	0,127	0,108
36	0,318	0,256	0,208	0,172	0,165	0,137	0,140	0,118	0,124	0,106
37	0,312	0,251	0,204	0,168	0,161	0,134	0,137	0,116	0,121	0,103
38	0,306	0,246	0,200	0,164	0,157	0,131	0,134	0,113	0,119	0,101
39	0,300	0,242	0,196	0,161	0,154	0,129	0,131	0,111	0,116	0,099
40	0,294	0,237	0,192	0,158	0,151	0,126	0,128	0,108	0,114	0,097

número de laboratorios en un determinado nivel
número de resultados de ensayo por celda (véase 7.3.3.3)

Figura 11
Tabla de valores críticos para la prueba de Cochran⁵

TABLA 5 - Valores críticos para la prueba de Grubbs

P	Uno más grande o uno más pequeño		Dos más grandes o dos más pequeños	
	Superior 1%	Superior 5%	Inferior 1%	Inferior 5%
3	1,155	1,155	-	-
4	1,496	1,481	0,000 0	0,000 2
5	1,764	1,715	0,001 8	0,009 0
6	1,973	1,887	0,011 6	0,034 9
7	2,139	2,020	0,030 8	0,070 8
8	2,274	2,126	0,056 3	0,110 1
9	2,387	2,215	0,085 1	0,149 2
10	2,482	2,290	0,115 0	0,186 4
11	2,564	2,355	0,144 8	0,221 3
12	2,636	2,412	0,173 8	0,253 7
13	2,699	2,462	0,201 6	0,283 6
14	2,755	2,507	0,228 0	0,311 2
15	2,806	2,549	0,253 0	0,336 7
16	2,852	2,585	0,276 7	0,360 3
17	2,894	2,620	0,299 0	0,382 2
18	2,932	2,651	0,320 0	0,402 5
19	2,968	2,681	0,339 8	0,421 4
20	3,001	2,709	0,358 5	0,439 1
21	3,031	2,733	0,376 1	0,455 6
22	3,060	2,758	0,392 7	0,471 1
23	3,087	2,781	0,408 5	0,485 7
24	3,112	2,802	0,423 4	0,499 4
25	3,135	2,822	0,437 6	0,512 3
26	3,157	2,841	0,451 0	0,524 5
27	3,178	2,859	0,463 8	0,536 0
28	3,199	2,876	0,475 9	0,547 0
29	3,218	2,893	0,487 5	0,557 4
30	3,236	2,908	0,498 5	0,567 2
31	3,253	2,924	0,509 1	0,576 6
32	3,270	2,938	0,519 2	0,585 6
33	3,286	2,952	0,528 8	0,594 1
34	3,301	2,965	0,538 1	0,602 3
35	3,316	2,979	0,546 9	0,610 1
36	3,330	2,991	0,555 4	0,617 5
37	3,343	3,003	0,563 6	0,624 7
38	3,356	3,014	0,571 4	0,631 6
39	3,369	3,025	0,578 9	0,638 2
40	3,381	3,036	0,586 2	0,644 5

tomada de la referencia [4] del anexo C, con el permiso de la American Statistical Association.

P = número de laboratorios en un determinado nivel

Figura 12

Tabla de valores críticos para la prueba de Grubbs⁵

Tabla A.2. La distribución <i>t</i> .				
<i>Valor de t para un intervalo de confianza de</i> <i>Valor crítico de t para valores de P de número</i> <i>de grados de libertad</i>	<i>90%</i>	<i>95%</i>	<i>98%</i>	<i>99%</i>
	<i>0.10</i>	<i>0.05</i>	<i>0.02</i>	<i>0.01</i>
1	6.31	12.71	31.82	63.66
2	2.92	4.30	6.96	9.92
3	2.35	3.18	4.54	5.84
4	2.13	2.78	3.75	4.60
5	2.02	2.57	3.36	4.03
6	1.94	2.45	3.14	3.71
7	1.89	2.36	3.00	3.50
8	1.86	2.31	2.90	3.36
9	1.83	2.26	2.82	3.25
10	1.81	2.23	2.76	3.17
12	1.78	2.18	2.68	3.05
14	1.76	2.14	2.62	2.98
16	1.75	2.12	2.58	2.92
18	1.73	2.10	2.55	2.88
20	1.72	2.09	2.53	2.85
30	1.70	2.04	2.46	2.75
50	1.68	2.01	2.40	2.68
∞	1.64	1.96	2.33	2.58

Figura 13
Tabla de valores de t de Student ¹²

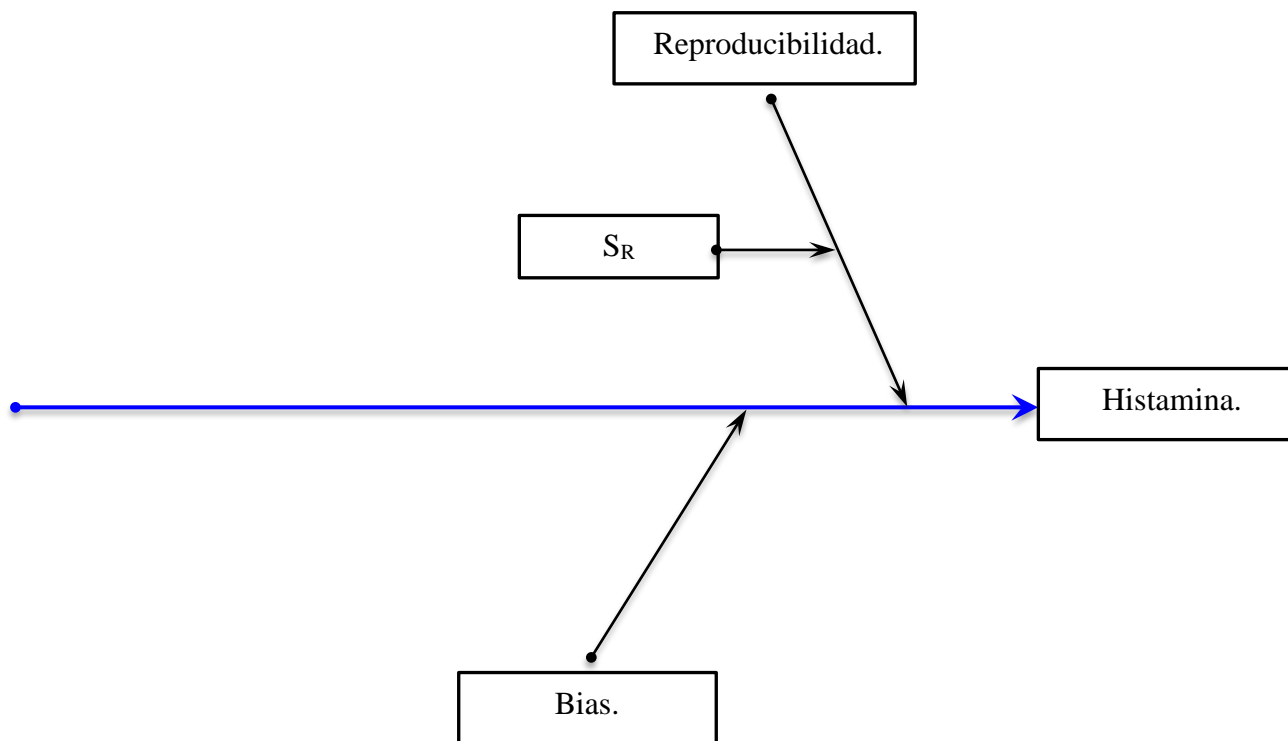
Tabla A Valores críticos de h de MANDEL.

LABORATORIO. Analista.	h de MANDEL.	
	al 1%	al 5%
3	1.15	1.15
4	1.49	1.42
5	1.72	1.57
6	1.87	1.66
7	1.98	1.71
8	2.06	1.75
9	2.13	1.78

Tabla B Valores críticos de K de MANDEL

LABORATORIO. Analista.	k																		
	al 1%									Lab.	al 5%								
	2	3	4	5	6	7	8	9	10		2	3	4	5	6	7	8	9	10
3	1.71	1.64	1.58	1.53	1.49	1.46	1.43	1.41	1.39	3	1.65	1.53	1.45	1.4	1.37	1.34	1.32	1.3	1.29
4	1.91	1.77	1.67	1.6	1.55	1.51	1.48	1.45	1.43	4	1.76	1.59	1.5	1.44	1.4	1.37	1.35	1.33	1.31
5	2.05	1.85	1.73	1.65	1.59	1.55	1.51	1.48	1.46	5	1.81	1.62	1.53	1.46	1.42	1.39	1.36	1.34	1.32
6	2.14	1.9	1.77	1.68	1.62	1.57	1.53	1.5	1.47	6	1.85	1.64	1.54	1.48	1.43	1.4	1.37	1.35	1.33
7	2.2	1.94	1.79	1.7	1.63	1.58	1.54	1.51	1.48	7	1.87	1.66	1.55	1.49	1.44	1.41	1.38	1.36	1.34
8	2.25	1.97	1.81	1.71	1.65	1.59	1.55	1.52	1.49	8	1.88	1.67	1.56	1.5	1.45	1.41	1.38	1.36	1.34
9	2.29	1.99	1.82	1.73	1.66	1.6	1.56	1.53	1.5	9	1.9	1.68	1.57	1.5	1.45	1.42	1.39	1.36	1.35

D.Fuentes de la estimación de la incertidumbre en el análisis de histamina.



E.Fuentes de la estimación de la incertidumbre en el Bias

