

Validación in-house y determinación de grasa por gravimetría en conservas de raciones de combate del Ejército de Tierra

Pérez Grana R.¹

Sanid. mil. 2014; 70 (2): 88-94; ISSN: 1887-8571

RESUMEN

Objetivos: Validación *in-house* y estimación de la incertidumbre mediante ensayos de recuperación en la determinación de grasa en conservas de raciones de combate, utilizando la información generada en el proceso de validación. **Material y métodos:** La determinación de la grasa se realiza por gravimetría, previa hidrólisis con ácido clorhídrico y extracción de la grasa con éter de petróleo 40-60 °, mediante el sistema *Soxtec System Tecator*. Se analizan matrices y concentraciones (baja, media y alta) representativas de las muestras de rutina utilizando un diseño anidado de tres factores. La veracidad del método se evalúa estimando el sesgo proporcional a partir de los ensayos de recuperación. La estimación de la incertidumbre se realiza aplicando la ley de propagación de la incertidumbre, agrupando términos relativos de incertidumbre de precisión, recuperación y pureza del estándar. La incertidumbre expandida se obtiene aplicando un factor de cobertura $K=2$ (nivel de confianza del 95%). **Resultados:** Se obtienen recuperaciones medias de grasa entre 0,95 y el 1,01 en tres niveles de concentración, por lo que la exactitud del método se considera buena. Los porcentajes de incertidumbre expandida relativa que se declaran para cada nivel de concentración de grasa son los siguientes: 0,50% (17,64%); 0,5-1,00% (13,09%); 1,00-16,55% (6,62%); 16,55-35,14% (6,00%); 35,14-50% (7,00%). **Conclusiones:** La incertidumbre se estima utilizando la información generada durante el proceso de estimación del sesgo proporcional y puede aplicarse al análisis de futuras muestras de rutina con este método analítico.

PALABRAS CLAVE: Incertidumbre. Recuperación. Grasa. Conservas. Raciones de combate. Ejército de Tierra.

Validation in-house and uncertainty estimation by recovery assays in fat gravimetric determination in canned foods of combat rations Spanish Army

SUMMARY: Objectives: Validation in-house and estimation of the uncertainty through recovery assays in determination of fat in canned foods of combat rations by gravimetric using the information generated in the validation process. **Material and methods:** Fat determination is carried out by gravimetric, previously hydrolyzed with hydrochloric acid and extraction of fat with ether of petroleum 40-60 °, by means of *Soxtec System Tecator*. Representative matrix and concentrations of the future routine samples are analyzed (low, medium, high) by using a nested design of three factors. The trueness of the method is evaluated by estimating the proportional bias starting from the recovery assays. The uncertainty estimate is carried out by applying the propagation law of errors, that contains terms of uncertainty of precision, recovery and standard purity. The expanded uncertainty is obtained applying a coverage factor $K=2$ (confidence level of 95%). **Results:** The accuracy of the method can be considered good. Fat recoveries are obtained between 0,95 and 1,01 for the three concentration levels. The percentages of relative expanded uncertainty that are declared for each concentration level of fat in the samples of routines are the following ones: 0,50% (17,64%); 0,50-1,00% (13,09%); 1,00-16,55% (6,62%); 16,55-35,14% (6,00%); 35,14-50% (7,00%). **Conclusions:** The estimated uncertainty is carried out by using the information generated during the proportional bias estimate process, and it can be applied to the future routine samples analysis by this analytic method.

KEYWORDS: Uncertainty. Recovery. Fat. Canned foods. Combat rations.

INTRODUCCIÓN

La validación de un método analítico es un componente esencial de las medidas que el laboratorio debe tomar para obtener datos analíticos fiables y comparables, y su autenticidad depende de la determinación cuidadosa de los criterios de cali-

dad del método analítico. En este sentido la responsabilidad de los analistas para asegurar que los informes proporcionan datos exactos tiene una gran importancia en las decisiones en salud pública que se puedan tomar en el ámbito de las Fuerzas Armadas.

Se admite generalmente que la adecuación a la finalidad o requerimientos perseguidos de un método analítico "*fitness for purpose*" no puede ser evaluado sin una estimación de la incertidumbre de la medida para comparar con la confianza requerida. Precisamente uno de los requisitos de la ISO 17025¹ para la acreditación es la estimación de la incertidumbre expandida, parámetro fundamental para la implementación de la trazabilidad como medio para asegurar la comparabilidad de resultados y una parte esencial de cualquier análisis cuantitativo. Puede suceder que dos métodos dan el mismo resultado, pero si la in-

¹ Tcol. Veterinario. Centro Militar de Veterinaria de la Defensa. Servicio de Bromatología y Seguridad Alimentaria. Madrid. España.

Dirección para correspondencia: Roberto Pérez Grana. Centro Militar de Veterinaria de la Defensa. Servicio de Bromatología y Seguridad Alimentaria. C/ Darío Gazapo, 3. 28024. Madrid. Tfno. 91-5122515. rpergra@oc.mde.es

Recibido: 24 de junio de 2013

Aceptado: 23 de enero de 2014

certidumbre es demasiado alta muchos resultados podrían estar fuera de los límites de aceptabilidad.

Los principios establecidos en GUM², publicada por ISO, también conocida como aproximación “*bottom-up*” para la evaluación y expresión de la incertidumbre en un amplio rango de medidas, son significativamente diferentes de los métodos utilizados en análisis nutricional, en los cuales generalmente se hace uso del método de forma global. Parámetros como la precisión y recuperación obtenidos durante la validación *in-house* constituyen una alternativa excelente para evaluar la incertidumbre de los métodos analíticos y evitar un excesivo coste en tiempo y esfuerzo³⁻⁷.

La amplia variabilidad de matrices y concentraciones de grasa de las conservas de raciones de combate, hace que los laboratorios de análisis nutricional tengan limitaciones en la validación de los métodos analíticos debido a la carencia de referencias con alto nivel de trazabilidad, tales como materiales certificados de referencia, ante la dificultad de emparejar la matriz y la concentración de las muestras de rutina con el material de referencia certificado. Por tanto, se recurre a referencias con un más bajo nivel de trazabilidad, como las muestras fortificadas o adicionadas, recurso menos costoso, con la desventaja de que el analito adicionado puede tener un comportamiento diferente del analito nativo, pero es una de las referencias frecuentemente utilizadas en los laboratorios de análisis.

La IUPAC “*Gold book*”⁸ define la recuperación como la fracción de la cantidad total de una sustancia recuperable siguiendo un procedimiento químico. El término recuperación se usa habitualmente para expresar la relación entre el analito encontrado con el método analítico frente a un valor de referencia. La IUPAC⁹ ha recomendado usar el término “recuperación aparente”, que se define como el valor observado, $x(\text{obs})$, derivado de un procedimiento analítico por medio de un gráfico de calibración dividido por el valor de referencia, $x(\text{ref})$. La “recuperación aparente” puede estimarse con técnicas de regresión¹⁰ o mediante el método de la recuperación media, según la siguiente expresión, donde R_m , es la recuperación media; R_{ij} es la recuperación obtenida para la muestra j adicionada con la cantidad i de analito; n es el número total de replicas adicionadas de analito, y p es el número de matrices adicionadas. R_{ij} se calcula como la relación entre la concentración encontrada y adicionada ($C_{e\ ij}/C_{a\ ij}$).

$$R_m = \frac{\sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n R_{ij}}{pn} \quad (1)$$

Uno de los parámetros más importantes en la validación de un método analítico es la estimación de la veracidad, que se considera en términos de recuperación¹¹ e implica la estimación del sesgo proporcional, que varía con la concentración y se evalúa en términos de “recuperación aparente”, variando la concentración adicionada y el intervalo de matrices de las muestras de rutina.

OBJETIVOS

Validación *in-house* y estimación de la incertidumbre mediante ensayos de recuperación en la determinación de grasa en

conservas de raciones de combate, utilizando la información generada en el proceso de validación, para poder aplicarse al análisis de futuras muestras de rutina con este método analítico.

MATERIAL Y MÉTODOS

Preparación de la muestra

Las conservas de las raciones de combate se trituran en la trituradora (Vorwerk, Germany) aplicando varios períodos de 10 sg de duración a la intensidad máxima, con lo que se consigue una mezcla de consistencia pastosa. La temperatura de la muestra al final de la trituración no debe sobrepasar 24°C y se mide con un termómetro con certificado de calibración. El tamaño de partícula se comprueba sobre un tamiz ISO 3310-1:2000 con tamaño de la malla $\leq 1\text{mm}$ y diámetro de 200 mm.

Las muestras una vez homogeneizadas se analizan tan pronto como sea posible y siempre dentro de las 24 horas siguientes, manteniéndose en refrigeración a una temperatura 2-8° C. No obstante, es posible congelar las muestras a -22 °C, descongelarlas en refrigeración, y a continuación analizarlas.

Método de análisis

El método de análisis se ha modificado con respecto a la norma ISO 1443-1973¹² y a los métodos analíticos de la AOAC¹³, y se ha elaborado un procedimiento interno de análisis de grasa en conservas (animales, vegetales y platos preparados) de las raciones de combate. En la metodología de validación se utilizan tres matrices representativas de la variabilidad de las muestras de rutina o futuras (melocotón en almíbar, paté y sardinas en aceite). A las muestras se les añade una referencia estándar (aceite de ricino, riqueza 99,7%) (Sigma-Aldrich) con lo que se obtienen concentraciones de grasa en el centro y en los extremos del rango de trabajo. Las muestras adicionadas con el analito y las muestras sin adicionar se analizan en la misma serie, en condiciones de precisión intermedia, y mediante un diseño anidado¹⁴, se varían dentro del laboratorio aquellos factores que afectan al procedimiento analítico (cantidad adicionada, matriz, precisión intermedia), hallándose la recuperación por triplicado.

La determinación de la grasa se realiza por gravimetría, previa hidrólisis con ácido clorhídrico 3N en ebullición durante 1 hora. La extracción de la grasa se realiza con éter de petróleo 40-60° mediante el sistema Soxtec System Tecator.

El cálculo de la repetibilidad se realiza a partir de la expresión siguiente, donde S_r es la estimación de la desviación estándar de la repetibilidad de las recuperaciones y n el número de series. Se asume que el error sistemático es el mismo en el intervalo de aplicación del método.

$$S_r = \sqrt{S_1^2 + S_2^2 + S_3^2 + \dots + S_n^2} / n$$

El límite de repetibilidad se obtiene según la expresión: $1,96 \sqrt{2} S_r^2$, para un nivel de confianza del 95%.

Para el estudio del sesgo proporcional del método analítico se calcula la recuperación media, R_m , y el estadístico t , de dos

colas, para determinar si el valor medio obtenido en las recuperaciones de grasa es significativamente diferente de 1¹⁵. La expresión siguiente se utiliza para hallar la recuperación aparente de cada serie:

$$R_i = \frac{C_{a+m} - C_m}{C_a}$$

En la que C_{a+m} = Cantidad añadida de analito y cantidad de analito en la muestra, C_m = Cantidad de analito en la muestra, y C_a = Cantidad de analito añadida a la muestra de análisis.

Y si R_m, que es una estimación media experimental de la recuperación aparente, obtenida con la expresión (1) no es estadísticamente diferente de 1, se debe satisfacer la siguiente inecuación:

$$|R_m - 1| \leq t_{\alpha/2, \text{eff}} u(\text{Sesgo})$$

$t_{\text{crit}} = \frac{|1 - R_m|}{u(\text{sesgo})}$; y para que el método sea veraz debe cumplirse que $t_{\text{exp}} < t_{\text{crit}}$

donde, R_m es la recuperación media, u(sesgo) es la incertidumbre del sesgo, y t_{α/2,eff} es el valor tabulado de dos colas para los grados de libertad efectivos asociados a u(sesgo) al 95% de confianza, calculados utilizando al aproximación de Welch-Sattherthwaite. La incertidumbre del sesgo se estima según la expresión:

$$u(\text{sesgo}) = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

donde, s es la desviación estándar de las n recuperaciones, y n el número de recuperaciones.

Fuentes de incertidumbre

Las fuentes de incertidumbre del mensurando se pueden identificar construyendo un diagrama causa-efecto. Entre las más significativas tenemos la masa de la muestra y la masa de la grasa extraída, la pureza del material estándar, variabilidad de las muestras de rutina, repetibilidad de la recuperación, pobre representación entre matrices utilizadas en el experimento y las correspondientes a las muestras de rutina y pobre representación del analito nativo en relación al analito adicionado. Este procedimiento resulta ortodoxo y la cuantificación de la incertidumbre estándar en etapas intermedias no siempre es fácil. En consecuencia se decide realizar la estimación de la incertidumbre de una forma global, considerando el proceso analítico de forma conjunta, y siguiendo las recomendaciones de la guía EURACHEM/CITAC¹⁶, se aprovecha la validación del método para calcular la incertidumbre de los resultados, de tal manera que se agrupan los términos relativos incertidumbre de la precisión, incertidumbre de la recuperación e incertidumbre de la pureza del material estándar que se adiciona a la muestra.

La incertidumbre combinada estándar u_c(y), usualmente denominada ley de propagación de la incertidumbre¹⁷, basada en una serie de primer orden de Taylor, y asumiendo que todas las fuentes de incertidumbre son proporcionales a la concentración de analito, los componentes individuales para modelos que implican un cociente $y = p/(q \times r \times \dots)$, se expresa por la suma de

incertidumbres relativas (u(p)/p) de los parámetros independientes, expresados como desviación estándar relativa:

$$u_c(y) = \% \text{grasa} \sqrt{\left(\frac{u(\text{prec})}{p}\right)^2 + \left(\frac{u(R_m)}{R_m}\right)^2 + \left(\frac{u(\text{pureza})}{P}\right)^2}$$

Y la incertidumbre expandida (U), se obtiene multiplicando la incertidumbre combinada estándar (u_c), por un factor de cobertura K=2, asimilable a un nivel de confianza del 95%.

RESULTADOS

En la tabla 1 se exponen los resultados estimados de las recuperaciones de grasa en matrices representativas de las muestras de rutina para los tres niveles de concentración.

Tabla 1. Recuperación media estimada para cantidades de grasa adicionada a tres niveles de concentración.

Nivel de concentración	n	R	S (R)
Bajo: 1,00% grasa	6	0,95 (0,90-1,01)	0,04
Medio: 16,55 grasa	6	1,01 (0,98-1,04)	0,02
Alto: 35,14%	15	1,01 (0,94-1,13)	0,06

n: número de réplicas analizadas.
R: recuperación media. S: desviación estándar de la recuperación.

Se obtiene un valor $t_{\text{exp}} < t_{\alpha/2, \text{eff}}$, y por consiguiente, R_m no difiere estadísticamente de 1, dentro de los límites de su incertidumbre, y se verifica la ausencia de sesgo proporcional significativo del método. No obstante, para niveles bajos de concentración de grasa se halla un sesgo proporcional significativo. En la tabla 2 se muestran los datos de repetibilidad y límite de repetibilidad para porcentajes de grasa bajo, medio y alto.

Tabla 2. Valores de repetibilidad y límite de repetibilidad con una probabilidad del 95% a tres niveles de concentración de grasa.

Nivel de concentración	Repetibilidad*	Límite repetibilidad 95%
Bajo: 0,5-10% grasa	0,032	0,064
Medio: 10-20% grasa	0,018	0,050
Alto: > 20% grasa	0,034	0,095

*En términos de recuperación

La diferencia máxima entre los resultados de dos recuperaciones utilizando muestras fortificadas, de acuerdo con la sistemática de validación, realizadas por el mismo analista, será en tanto por uno, igual o inferior, a los datos de la Tabla 3.

Asimismo, la exactitud del método se considera buena, obteniéndose recuperaciones entre 0,90 y 1,13, con unas recupe-

Tabla 3. Diferencias entre recuperaciones para los Porcentajes de grasa indicados.

% Grasa	D _R
0,5-10	≤ 0,06
10-20	≤ 0,05
20-50	≤ 0,09

raciones medias entre 0,95 y 1,01, incluyendo los tres niveles de concentración.

La precisión intermedia del método o reproductibilidad intra-laboratorio, estimada sobre los datos de recuperación, expresada como desviación estándar relativa (DER), se considera satisfactoria, según los siguientes porcentajes:

- Nivel de concentración bajo: 4,05%
- Nivel de concentración medio: 2,17%
- Nivel de concentración alto: 5,64%.

Y se estima el intervalo de recuperaciones válido, entre 0,86 y 1,16 (nivel de confianza del 95%), para los tres niveles de concentración estudiados. En las tablas 4, 5 y 6 se exponen los datos con los parámetros utilizados para la estimación de la incertidumbre expandida relativa ($U_{exp\ rel}$).

Tabla 4. Porcentaje de incertidumbre expandida relativa para un porcentaje de grasa del 1,00% (Nivel de concentración bajo).

Valor	Valor medio (x)	u estándar u(x)	u estándar relativa u(x)/x	u_c	$U_{exp\ rel}$
Precisión	0,956	0,0388	0,0405	0,0436	8,73%
Sesgo	1,0	0,016	0,0158		
Pureza	99,7	0,17	0,0017		

Tabla 5. Porcentaje de incertidumbre expandida relativa para un porcentaje de grasa del 16,55% (Nivel de concentración medio).

Valor	Valor medio (x)	u estándar u(x)	u estándar relativa u(x)/x	u_c	$U_{exp\ rel}$
Precisión	1,07	0,022	0,0205	0,0238	4,50%
Sesgo	1,0	0,009	0,0089		
Pureza	99,7	0,17	0,0017		

Tabla 6. Porcentaje de incertidumbre expandida relativa para un porcentaje de grasa del 35,14% (Nivel de concentración alto).

Valor	Valor medio (x)	u estándar u(x)	u estándar relativa u(x)/x	u_c	$U_{exp\ rel}$
Precisión	0,99	0,034	0,0343	0,0375	7,50%
Sesgo	1,0	0,015	0,0152		
Pureza	99,7	0,17	0,0017		

El límite de cuantificación del método se estima en un 0,2% y la estimación de la incertidumbre expandida relativa, $U_{exp\ rel}$, para la concentración del 0,50% de grasa, se realiza a partir de la incertidumbre absoluta constante para la concentración de 1,00%, y se obtiene un valor del 17,46%.

Tabla 7. Declaración de incertidumbre expandida relativa (% $U_{exp\ rel}$) para los intervalos de concentración de grasa.

Grasa	% $U_{exp\ rel}$
0,5%	17,46%
0,5-1,00%	13,09%
1-16,55%	6,62%
16,55-35,14%	6,00%
35,14-50%	7,50%

La incertidumbre expandida relativa ($U_{exp\ rel}$) para cada nivel de concentración de grasa son las que se declaran en la Tabla 7.

En la figura 1 se representa la contribución de la precisión, sesgo y pureza del material estándar a la contribución de la incertidumbre expandida relativa combinada.

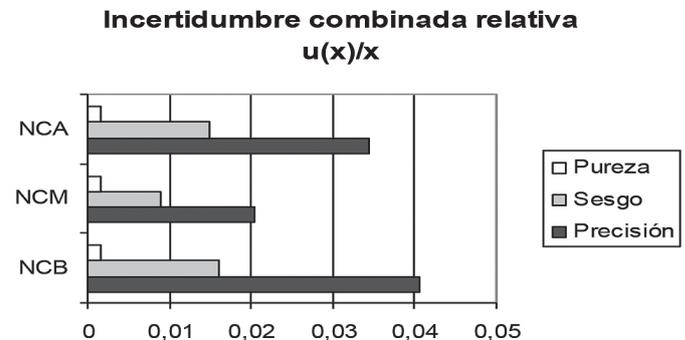


Figura 1. Contribución de la pureza del material estándar, sesgo y precisión a la medida de la incertidumbre estándar relativa combinada. NCA = Nivel de concentración alto. NCM = Nivel de concentración medio. NCB = Nivel de concentración bajo.

DISCUSIÓN

El procedimiento analítico ha sido validado globalmente con inclusión del tratamiento de la muestra antes del análisis, y abarca todo el rango de concentraciones del analito, que representan el rango normal de trabajo del método o la concentración esperada en la muestra, y las matrices representativas de las muestras de rutina o futuras. En todo caso se ha considerado un equilibrio entre coste y beneficio en la estimación de la incertidumbre, dada la gran variabilidad de matrices que pueden afectar a las muestras de rutina.

Las muestras fortificadas o adicionadas se preparan añadiendo aproximadamente la misma cantidad de analito a cada muestra individual, con concentración inicial de analito, por considerarse poco práctico realizar submuestras a partir de una masa de muestra adicionada, y con ello se evita introducir una incertidumbre derivada de la homogeneización.

En aquellos casos en los que la concentración de analito nativo es apreciable, la adición del analito se realiza de tal manera que la concentración final en la porción test sea similar a la concentración de analito nativo para evitar incurrir en una elevada incertidumbre relativa en la recuperación del analito adicionado¹⁸. Es de esperar que el resultado resultante de la estimación de la recuperación en muestras reales tenga un sesgo, ya que una incompleta recuperación deriva a sesgo, sobretudo en métodos analíticos de estas características que incluyen varios pasos de transferencia de masa que implican eficiencias diferentes del 100% (extracción, digestión, etc.)¹⁹.

La recuperación del analito adicionado puede diferir de la recuperación del analito nativo, ya que no se produce una total destrucción de la muestra durante la hidrólisis, además las muestras adicionadas poseen matrices complejas sólidas o semisólidas, y tampoco se espera que el analito sea quimioabsorbido por la matriz, y el analito adicionado podría tener una recuperación

más alta que el analito nativo al tener distinto comportamiento. Por este motivo, se obtienen recuperaciones inferiores y superiores al 100% en cuanto a “recuperación aparente”, debido a que en el cálculo de la misma se introducen errores procedentes de la cantidad de grasa de la muestra con analito nativo y de los procedentes de la extracción de la grasa adicionada. Es de resaltar que la veracidad de los métodos analíticos no puede ser garantizada por la posibilidad de existencia de un sesgo constante²⁰, independiente de la concentración, cuyo estudio será objeto de futuras investigaciones. Por otro lado EURACHEM y otras aproximaciones no consideran el hecho de que pueda existir un sesgo constante en los métodos analíticos.

Una idea más aproximada del comportamiento del analito nativo sería el análisis de un MRC que contenga un analito más difícil de extraer que el de las muestras reales, y la recuperación observada proporcionará una recuperación “worst case” y se podría asumir que la recuperación de las muestras reales probablemente estarán más próximas a 1.

Siguiendo las recomendaciones de la IUPAC²¹ la adición se hace a tres niveles de concentración (bajo, medio, alto), en los extremos y en el valor medio del intervalo de concentraciones de las muestras de rutina o muestras futuras, ya que la recuperación y su incertidumbre estándar suelen depender de la concentración de analito²², y el cambio de la incertidumbre con la concentración es atribuible a la recuperación del método²³.

En este trabajo experimental se utiliza el método de la recuperación media, que es el resultado de la estimación de la recuperación de cada cantidad de analito adicionado a diferentes matrices que son representativas de las muestras futuras. Este método podría proporcionar incertidumbres menores que el método de adiciones estándar. Precisamente una de las limitaciones de la técnica de adiciones estándar es que puede obtenerse una estimación incorrecta del sesgo proporcional si se produce un efecto interactivo entre la matriz y el analito²⁴.

Las consideraciones estadísticas recomiendan realizar $3 \leq n \leq 5$ replicados en cada nivel de concentración y, en este caso, el empleo de un diseño anidado de tres factores (cantidad adicionada, factor analito-matriz y precisión intermedia), permite obtener información útil para la estimación de la incertidumbre²⁵, ya que los resultados de los ensayos de recuperación se ven afectados por estos factores.

De acuerdo con las recomendaciones anteriores, se realizan análisis por triplicado, que además de ajustarse a las características del instrumento, permite analizar conjuntamente las muestras con analito nativo y analito adicionado. El número de replicados realizados se considera suficiente para proporcionar una fiable estimación de la desviación estándar de los resultados. Estadísticamente se ha demostrado que con menos de 6 replicados el intervalo de confianza de la población llega a ser muy amplio, y más allá de 15 replicados hay pocos cambios en el intervalo de confianza.

En la bibliografía se citan datos de recuperación con un rango de tolerancia para residuos químicos entre el 70-120%²⁶. Similares datos se han obtenido en recuperaciones de grasa en alimentos diversos (77-134%)²⁷. En otros trabajos se detallan unas recuperaciones aceptables, en%, dependiendo del nivel de concentración de analito: 100% (98-102); 10% (98-102); 1 (97-103)²⁸. En nuestro caso se observa una ligera desviación

respecto a estos datos para concentraciones de grasa del 1%, al obtenerse una recuperación media del 95%.

En 3 ensayos de aptitud realizados en nuestro laboratorio, para un valor de grasa asignado del 2,66%, se ha conseguido una recuperación del 92%; para un valor del 30,40%, se recupera un 97,07%, y para un valor del 18,26%, se recupera un 95,70%. Por consiguiente, existe un sesgo de recuperación que puede depender, especialmente de la concentración, y de la matriz, de errores aleatorios, y sería factible corregir los resultados para niveles de concentración bajos de grasa.

Otro aspecto importante de la validación es el estudio de resultados anómalos “outliers”, que se realiza mediante el criterio R de Grubb’s, recomendado por la (ISO 5725-2)²⁹, que supone que la población es normal. En este sentido el teorema del límite central proporciona el fundamento estadístico para esperar una distribución normal en una media de datos experimentales sujetos a errores aleatorios. No obstante, para verificar que los datos individuales se ajustan a una distribución normal se ha utilizado el test de Kolmogorov-Smirnov, test de asimetría, test de curtosis y el diagrama de puntos. Los resultados obtenidos con el test de curtosis (momento de cuarto orden) y asimetría (momento de tercer orden) para una distribución normal se hallan dentro del intervalo [-2, 2].

Aunque existen muchos tests estadísticos para comprobar la normalidad de los datos, y ninguno garantizado para rechazar o conservar los valores de datos individuales, sólo unos pocos tienen la suficiente potencia para ser usados en análisis nutricional, en donde habitualmente se manejan pocos datos. Tampoco es infrecuente encontrar resultados contradictorios en contrastes de datos anómalos, por ejemplo, entre el contraste de Grubb’s y el test Q de Dixon. No cabe duda, que al rechazar un valor la precisión suele mejorar, de ahí la importancia de ser cauto a la hora de rechazar datos anómalos, y sobre todo cuando las medidas se registran pocas veces, el rechazo de un valor origina una gran variación sobre la media y la desviación estándar. Esta dificultad explica el uso creciente de métodos estadísticos no paramétricos y robustos, al ser insensibles a valores extremos. No obstante, nuestro criterio es buscar las causas que generan datos anómalos, incluyendo factores humanos³⁰, antes de proceder a descartarlos. En todo caso los criterios subjetivos no son válidos para considerar un resultado como discrepante.

Cuando la recuperación aparente no es estadísticamente diferente de 1, se puede concluir que el método analítico no tiene sesgo proporcional significativo. Pero cuando se valora la veracidad siempre existe una probabilidad de concluir que el sesgo proporcional no es significativo. Los resultados de simulación de la recuperación aparente con el método Monte-Carlo muestran que el sesgo no significativo puede infraestimar la incertidumbre de los resultados y los porcentajes de exactitud de futuros resultados serían más bajos del 95%.

En realidad no sería necesario aplicar un factor de recuperación $X_{\text{corr}} = F_{\text{Hom}} \times c/R_m$ a las futuras muestras de rutina que se analizarán con el procedimiento³¹⁻³⁴, salvo para niveles de concentración $\leq 1\%$ de grasa en donde la recuperación es significativamente diferente de 1. En la expresión anterior, c es la concentración al analizar la muestra, R_m la recuperación media, X_{corr} , resultado obtenido para futuras muestras y F_{hom} será 1 a efectos prácticos.

La precisión del método constituye un factor importante en la incertidumbre combinada, expresada como desviación estándar de las recuperaciones, y es similar en orden de magnitud para los tres niveles de concentración estudiados. Esto indica que esta desviación estándar es independiente de la concentración. Cabe decir que la relación entre la precisión, expresada como desviación estándar, y la concentración en un sistema analítico puede seguir otro tipo de modelos, incluyendo modelos hiperbólicos³⁵.

Los niveles de precisión, expresados como desviación estándar relativa, hallados experimentalmente, en tres niveles de concentración son los siguientes: nivel bajo (1,00%/2,20%), nivel medio (16,55%/1,88%) y nivel alto (35,14%/1,14%), son ligeramente inferiores a los que predice la ecuación de Horwitz de acuerdo con la ecuación empírica:

$$DER = 2^{(1-0,5 \log C)}_{36-39}$$

Los ensayos de recuperación pueden verse afectados por otros componentes que pueden afectar a la recuperación⁴⁰, como por ejemplo, el factor R_s , que afecta a las diferencias de recuperación para una muestra real comparada con la recuperación observada para el material usado para estimar R_m , que es una estimación de la recuperación media del método. Por este motivo se analizan un rango representativo de muestras adicionadas, cubriendo matrices típicas y concentraciones de analito. Otro factor a considerar es, R_{rep} , que afecta a la muestra adicionada y puede tener un comportamiento diferente a la muestra real con analito nativo. Por lo tanto, se deduce que la incertidumbre en R , $u(R)$, tendrían contribuciones de $u(R_m)$, $u(R_s)$, y $u(R_{rep})$. La incertidumbre $u(R_s)$ es, por tanto, la desviación estándar de las recuperaciones medias para cada muestra tipo, y se ha considerado despreciable, así como $u(R_{rep})$.

Hay que tener presente que la incertidumbre de la medida a muy baja concentración, por ejemplo, para porcentajes de grasa del 0,5%, cercana al límite de detección del método, que se estima en un 0,2%, podría incrementarse fuertemente, y la suposición de que la incertidumbre relativa es constante no puede aceptarse en algunos casos. Por ello, se aplica una transición a incertidumbre constante absoluta en el más bajo límite del rango de aplicación, es decir, una incertidumbre absoluta por debajo del 1%, y en el intervalo del 0,50% al 1% de grasa, se obtiene una incertidumbre relativa estimada del 13,09%.

Existe un conocimiento bien estabilizado entre la incertidumbre y la concentración, que puede ser usado para justificar la conversión de la incertidumbre absoluta en un valor relativo. La incertidumbre expandida relativa no se espera que varíe como una función de la concentración, cuando las medidas se han hecho por encima de su límite de detección (> 10 veces), y la incertidumbre absoluta cambiaría proporcionalmente con la concentración en cada serie futura⁴¹.

Además, el parámetro que más contribuye a la medida de la incertidumbre es la precisión del método, y probablemente se explica por la complejidad de la matriz y los errores aleatorios. Es de reseñar que la contribución al resultado final debido a la incertidumbre de la cantidad de material estándar adicionado se considera despreciable.

La pureza de la referencia estándar (aceite de ricino) se ha considerado un parámetro de influencia en la determinación de

la incertidumbre pese a tener una contribución menor del 20% de la mayor contribución de la incertidumbre combinada estándar relativa. En este caso para el estándar la pureza es $\geq 99,7\%$, y se toma el intervalo entre el 99,7% y el 100% como límite de una función distribución de probabilidad que se asume rectangular^{42,43} (media $\pm 58\%$), con una anchura de $2a$ del 0,3%, que corresponde a una incertidumbre estándar de $0,6 \times 0,3\% = 0,0018$.

La incertidumbre expandida, para $k=2$, se estima en un 10,56%, considerando globalmente los tres niveles de concentración, y resulta inferior a la estimación (19,15%), utilizando los datos de reproducibilidad de tres estudios interlaboratoriales citados anteriormente.

CONCLUSIONES

1. La incertidumbre estimada para cada nivel de concentración se realiza utilizando la información generada durante el proceso de validación y puede aplicarse al análisis de futuras muestras de rutina con este método analítico.
2. La incertidumbre asociada con la precisión es el término que más contribuye a la incertidumbre combinada.
3. Se observa que la recuperación depende de la concentración de analito.

BIBLIOGRAFÍA

1. ISO/IEC 17025. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. European Committee for Standard. Brussels. 2005.
2. Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement, ISO, Geneva, Switzerland, 1993.
3. Ellison SLR, Barwick VJ. Using validation data for ISO measurement uncertainty estimation. Part 1. Principles of an approach using cause and effect analysis. *Analyst* 1998; 123: 1387-1392.
4. Maroto A, Boqué R, Riu J, Rius X. Effect of non-significant proportional bias in the final measurement uncertainty. *Analyst* 2003; 128:373-378.
5. Feinberg M, Laurentie M. A global approach to method validation and measurement uncertainty. *Accred Qual Assur* 2006; 11: 3-9.
6. Cuadros Rodríguez L, Torres Hernández ME, Almansa López E, Egea González FJ, Arrebola Liébanas FJ, Martínez Vidal JL. Assessment of uncertainty in pesticide multiresidue analytical methods: main sources and estimation. *Anal Chim Acta* 2002; 454:297-314.
7. Williams A. Introduction to measurement uncertainty in chemical analysis. *Accred Qual Assur* 1998; 3: 92-94.
8. IUPAC "Gold book". Internet: <http://goldbook.iupac.org>. Último acceso: 4/02/2013.
9. Thompson M, Ellison S.L.R., Wood R.A. Harmonised Guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. *Pure Appl Chem* 2002; 74 (5): 2201-2205.
10. Maroto A, Boqué R, Riu J, Rius FX. Measurement uncertainty in analytical methods in which trueness is assessed from recovery assays. *Anal Chim Acta* 2001; 440:171-184.
11. Barwick VJ, Ellison LR. VAM Project 3.2.1. Development and Harmonization of Measurement Uncertainty Principles. Part D: Protocol for Uncertainty Evaluation from Validation Data, January 2000. Report No: LGC/VAM/1998/088.
12. ISO 1443-1973. Meat and Meat Products. Determination of total fat content.
13. McNeal JE. Meat and Meat Products. En: *Official Methods of Analysis*. Volume two. AOAC. 15th Edition. USA: 1990: 931-948.
14. ISO Guide 5725-3:1994/Cor.1:2001. Accuracy (Trueness and Precision) of Measurement Methods and Results. Part 3: Intermediate measures of the precision of a standard measurement method. Genève.

15. Bagur G, Sánchez-Viñas M, Gázquez D, Ortega M, Romero R. Estimation of the uncertainty associated with the standard addition methodology when a matrix effect is detected. *Talanta* 2005; 66: 1168-1174.
16. Ellison SLR, Rosslein M, Williams A. EURACHEM/CITAC Guide. Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement. 2nd Edition. 2000.
17. Mekid S, Vaja D. Propagation of uncertainty: Expressions of second and third order uncertainty with third and fourth moments. *Measurement* 2008; 41: 600-609.
18. Thompson M, Ellison SLR, Fajgeli A, Willetts P, Wood R. Harmonised guidelines for the use of recovery information in analytical measurement. *Pure Appl Chem* 1999; 71 (2): 337-348.
19. Bettencourt da Silva RJN, Lino MJ, Santos RJ, Camoes FGFC. Estimation of precision and efficiency mass transfer steps for the determination of pesticides in vegetables aiming at the expression of results with reliable uncertainty. *Analyst* 2000; 125: 1459-1464.
20. Hund E, Massart DL, Smeyers-Verbeke J. Operacional definition of uncertainty. *Trends Anal Chem*, 2001; 20 (8): 394-406.
21. Thompson M, Ellison S.L.R., Wood R.A. Harmonised Guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. *Pure Appl Chem* 2002; 74 (5): 835-855.
22. Gustavo González A, Herrador MA, Asuero AG. Practical digest for evaluation the uncertainty of analytical assays from validation data according to the LGC/VAM protocol. *Talanta* 2005; 65: 1022-1030.
23. Armishaw P. Estimating measurement uncertainty in a afternoon. A case study in the practical application of measurement uncertainty. *Accred Qual Assur* 2003; 8:218-224.
24. García Campaña AM, Rodríguez Cuadros L, Muñoz Aybar J, Alés Barbero F. Chemometric protocol to validate an analytical method in the presence of corrigible constant and proportional systematic errors. *J AOAC International* 1997; 80: 657-664.
25. Willetts P, Wood R. Measurement uncertainty – a reliable concept in food analysis and for the use of recovery data? *Accred Qual Assur* 1998; 3:231-236.
26. Parker GA. Validation of methods used in the Florida Department of Agricultural and Consumer Services Chemical Residue Laboratory. *J Assoc Off Anal Chem* 1991; 74: 868-871.
27. Thiex NJ, Gildemeister B. Crude fat, hexanes extraction, in feed, cereal grain, and forage (Randall/Soxtec/Submersion Method): Collaborative Study. *J AOAC International* 2003; 86:899-908.
28. González AG, Herrador MA. A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles. *Trends Anal Chem* 2007; 26:227-238.
29. ISO Guide 5725-2:1994/Cor.1:2001. Accuracy (Trueness and Precision) of Measurement Methods and Results. Part 2: Intermediate measures of the precision of a standard measurement method. Genève.
30. Kuselman H, Pennechi F, Fajgelj A, Karpov Y. Human errors and reliability of test results in analytical chemistry. *Accred Qual Assur* 2013; 18: 3-9.
31. Linsinger TPJ. Use of recovery and bias information in analytical chemistry and estimation of its uncertainty contribution. *Trends Anal Chem* 2008; 27:916-923.
32. Haesselbarth W. Accounting for bias in measurement uncertainty estimation. *Accred Qual Assur* 2004; 9: 509-514.
33. Synek V. Effect of significant bias and its uncertainty on the coverage probability or uncertainty intervals. Part 2. Evaluation for a found insignificant experimental bias. *Talanta* 2007; 70: 1304-1311.
34. Synek V. Effect of significant bias and its uncertainty on the coverage probability or uncertainty intervals. Part 1. Evaluation for given value of true bias. *Talanta* 2006; 70: 1024-1034.
35. Thompson M. Variation of precision with concentration in an analytical system. *Analyst* 1988; 113: 1579-1587.
36. Thompson M, Lowthan PJ. The Horwitz Function revisited. *J AOAC International* 1997; 80: 676-679.
37. Alder L, Korth W, Patey AL, Van der Schee H. Estimation of measurement uncertainty in pesticide residue analysis. *J AOAC International* 2001; 84: 1569-1574.
38. Linsinger TPJ, Ralf DJ. Limitations of the application of the Horwitz equation. *Trends Anal Chem* 2006; 25: 1125-1130.
39. Wood R. How validate analytical methods. *Trends Anal Chem* 1999; 18:624-632.
40. Barwick VJ, Ellison SLR. Measurement uncertainty: Approaches to the evaluation of uncertainties associated with recovery. *Analyst* 1999; 124:981-990.
41. Ramsey MH, Ellison SLR. Reply to comments on EURACHEM /CITAC guide “Measurement uncertainty arising from sampling”. *Accred Qual Assur* 2010; 15: 533-535.
42. Wong KS. Purity verification and measurement uncertainty. *Accred Qual Assur* 2010; 15: 337-341.
43. BIPM, IEC, IFCC, ISO, IUPAC, IUPAP, OIML. Guide to the expression of uncertainty in measurement ISO, Genève, 1993.